

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



**Papel del receptor Dectin-1 humano en la
respuesta inmune frente a *Candida albicans*:
implicación de la ruta mediada por la MAP
quinasa fúngica Cek1**

TESIS DOCTORAL

Marta Galán Díez

2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



**Papel del receptor Dectin-1 humano en la
respuesta inmune frente a *Candida albicans*:
implicación de la ruta mediada por la MAP
quinasa fúngica Cek1**

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

Marta Galán Díez

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

**Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Biología Molecular del Hospital
Universitario de la Princesa (Madrid), bajo la dirección de la Dra. Elena
Fernández Ruiz.**

Fdo. Dra. Elena Fernández Ruiz

Portada: Imágen de microscopía confocal que muestra células dendríticas humanas derivadas de monocitos fagocitando levaduras de *Candida albicans*. Todas las levaduras se muestran en color verde, salvo las extracelulares (no internalizadas) que se muestran en azul. Los filamentos celulares de actina aparecen en rojo.

A mis padres,

A Julián

Sin investigación no hay progreso.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Lo último que uno sabe es por donde empezar, pero desde que comencé a pensar en la idea de escribir esta Tesis, tuve muy claro que esta parte sería de gran importancia para mí, por lo que trataré de no dejar nada ni a nadie en el tintero. Mi amor por la Ciencia comienza desde muy pequeña, casi desde que tengo eso que se llama “uso de razón”. Recuerdo ir con mi padre al laboratorio de mi abuelo, en la Facultad de Ciencias de mi Salamanca natal y trastear con aquellas placas Petri de cristal, matraces y todo tipo de utensilios de laboratorio. También recuerdo ir con mi abuelo y mi padre a la plantación de *Ecballium* en la que cultivaban cientos de esos “pepinillos del diablo” con los que me encantaba jugar y escuchar cómo trataban de explicarle a una niña cómo se determinaba el sexo en las plantas. Establecí en mi cuarto de baño un mini-laboratorio con los “cacharros” que iba “cogiendo” del laboratorio de mi padre y pasaba horas jugando allí dentro. A medida que fui creciendo, fui entendiendo mejor qué era eso de la Investigación y la Ciencia. Vi las enormes alegrías y satisfacciones que podía provocar, del mismo modo que me di cuenta de las tremendas desilusiones que la acompañaban a veces. Aún así, siempre lo tuve claro, cuando te hacían la típica pregunta de “¿qué quieres ser de mayor?”, siempre decía lo mismo: “¡científica, como mi abuelo!”. Precisamente por eso, a la persona a la que quiero dedicar mi Tesis es a mi abuelo, Fernando Galán-Gutiérrez, por todo lo que hizo por la Ciencia en España y por esa dedicación casi exclusiva a ella. No obstante, yo no sería lo que soy si no es por mis padres, los mejores padres que hubiese podido imaginar, que siempre me han ayudado, apoyado, siempre han estado a mi lado, enseñándome y corrigiéndome, transmitiéndome todos sus valores. Tengo tantísimas cosas que agradecer que el hecho de intentar plasmarlas aquí se me hace imposible. Sólo por haberme dado la vida que a día de hoy puedo disfrutar con tanta alegría, os lo debo todo. Gracias mamá por enseñarme que estudiar te hace ser libre y pensar por ti mismo y porque gracias a ti, soy capaz de organizar y hacer mil cosas a la vez, tuve y tengo una gran maestra... Gracias papá por transmitirme que si me gustaba la ciencia, la siguiese, pues no dejaría de darme satisfacciones inigualables; que aunque menores que las decepciones, los logros en la investigación provocan una sensación indescriptible, parecida al orgullo pero que va más allá. Gracias a los dos por confiar siempre en mí y por animarme a no tirar nunca la toalla. Esta Tesis es por y para vosotros.

Querría también agradecer su mera existencia, que hace que la mía sea tan feliz como es, al resto de mi familia (especialmente a mi abuela y mi tío) y de forma muy particular a mis amigas: a mi doctora, mi farmacéutica, mi abogada, mi ingeniera y mis biólogas, gracias a las siete por compartir conmigo algunos de los mejores momentos de mi vida, porque para mí la amistad es el bien más preciado y tengo la suerte de teneros al lado. Gracias a todas aquellas personas con las que he compartido años de carrera y posteriormente de laboratorio. Gracias a mis chicos del CNB con los que tantísimo me he reído, a Desi y a “los magras”, a David y en particular a César, uno de los mejores investigadores que conozco y con el que tuve la gran suerte de aprender en mis inicios. Gracias “a los de la 1ª”, en especial a Esteban, por brindarme la oportunidad que me brindaste y confiar en mí, eres una gran persona. A Diego, porque cambiaste mi forma de trabajar en el laboratorio, porque aclaraste muchas de mis dudas y porque fue muy fácil aprender y trabajar contigo. A mi gente “de la 9ª”, a los de siempre: Mara, Mª Luisa, a mi brujilla Alejandra, Samu, Iñaki, a mi Pedrito, a mi castellana preferida, Mati; a los que llegasteis después: Patri (por tu alegría contagiosa), Pilar, Isabel, Ricardo, a mi “ratilla” Álvaro...pero en especial: ¡gracias Paqui!. Sin ti quizá esto no hubiera sido posible. Eres una de las personas más especiales de mi vida, me llevo muuuucho más que una estupenda “profesora” de laboratorio que me ha ayudado más que nadie en este mundillo, me llevo una gran persona y por suerte, una gran amiga para toda la vida.

Mención especial merece Elena. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo. Mil gracias por ser mucho más que una jefa, una gran amiga. Gracias por confiar tanto en mí, por entenderme y dejarme hacer las cosas a mi manera (soy muy cabezota), por los grandes momentos que hemos vivido juntas en Edimburgo, Canadá, Oslo...en tu despacho, codo con codo...gracias por hacerme entender que se puede ser científicA!. Espero mantener esta complicidad siempre.

He dejado para el final a la persona que cambió mi vida, a Julián. ¿Qué decirte?. Cambiaste mi forma de vivir y de sentir, compartes conmigo la que considero es la mejor etapa de mi vida hasta el momento. Gracias por todo. Gracias por existir y por renunciar a tu Asturias del alma (que también corre por mis venas) para vivir conmigo. Gracias por seguirme, por empujarme y darme fuerzas. Gracias por escucharme, gracias

por entenderme, gracias por apoyarme y gracias por alegrarte tanto por mí en los buenos momentos. Eres la persona con el corazón más grande que he conocido nunca y tengo la gran suerte de que quieras compartir proyectos y una vida conmigo. Esta Tesis también va por ti.

La ciencia es una pasión de la que es muy difícil escapar una vez que ya la conoces. Cada vez descubro que hay más y más, y a veces tengo la sensación de que nunca podré disfrutarla y entenderla en su totalidad, cosa que la hace aún más llamativa. Curiosamente, como dijo Carl Sagan, vivimos en una sociedad exquisitamente dependiente de la Ciencia, en la que casi nadie sabe nada de Ciencia; habrá que tratar de cambiar esta tendencia. Cuando era niña quería ser científica y me gustaría mantener ese espíritu de la aventura intelectual, haciéndome mayor, pero manteniendo la juventud gracias a la Ciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	25
SUMMARY.....	31
INTRODUCCIÓN.....	35
1. EL SISTEMA INMUNE.....	35
1.1. Inmunidad innata y adaptativa.....	35
1.2. Células dendríticas y macrófagos.....	37
2. INMUNIDAD ANTIFÚNGICA: RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS...39	
2.1. Receptores de reconocimiento de patrones, PRRs.....	40
• Receptores de tipo <i>Toll</i> : TLRs.....	41
• Receptores de tipo lectina-C: CLR.....	42
2.2. Patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs.....	44
• Mananos y manoproteínas.....	45
• β -glucano.....	46
3. DECTIN-1.....	47
3.1. Descripción, estructura y expresión de Dectin-1.....	47
3.2. Ligandos, señalización y respuestas controladas por Dectin-1.....	50
3.3. Función de Dectin-1 en el control de la infección fúngica.....	55
4. <i>CANDIDA ALBICANS</i>.....	58
4.1. Estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i>	59
4.2. Morfología de <i>C. albicans</i> : relación entre el dimorfismo y la virulencia....	61
4.3. Rutas de MAP quinasas de <i>C. albicans</i> y su implicación en virulencia.....	63
4.4.....	
OBJETIVOS.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
• Cepas de <i>Candida albicans</i> usadas, condiciones de crecimiento, marcaje e inactivación de las mismas.....	73
• Crecimiento de líneas celulares.....	73

• Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	73
• Generación de transfectantes estables de Dectin-1 en células K562.....	74
• Obtención de macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos humanos (hMΦ y hDC).	74
• Producción de las proteínas solubles de Dectin-1: sDectinFc y sDectinFlag.....	75
• Desarrollo y obtención del anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano MGD3.....	75
• Ensayos de unión (<i>binding</i>) a <i>Candida albicans</i>	76
• Ensayos de fagocitosis.....	76
• Ensayos de eliminación o aniquilamiento (<i>killing</i>) con hDCs y hMΦs.....	77
• Ensayos de Western Blot.....	77
• Ensayos de luciferasa.....	78
• Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	78
• Estimulación de la secreción de citoquinas en hDCs.....	78
• Inmunofluorescencia y citometría de flujo.....	79
• Análisis estadístico.....	79
RESULTADOS.....	83
1. OBJETIVO: Determinar si existe un reconocimiento diferencial de los mutantes en las rutas MAPKs de <i>C. albicans</i> por parte del sistema inmune.....	83
1.1. Determinación de los niveles de unión de las cepas mutantes en las cuatro rutas MAPKs identificadas en <i>C. albicans</i> a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) implicados en su detección.....	83
• Los mutantes en la ruta de MAPK mediada por <i>CEK1</i> de <i>C. albicans</i> presentan una unión preferencial a Dectin-1.....	83
1.2. Análisis de la especificidad de unión a Dectin-1 de los mutantes en la ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> de <i>C. albicans</i>	85
• La unión de <i>C. albicans</i> mediada por Dectin-1 se ve incrementada específicamente en los mutantes de delección <i>cek1</i> y <i>hst7</i> en comparación con la de la cepa silvestre CAF2.....	85
2. OBJETIVO: Caracterizar estructural y funcionalmente los mutantes en la ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> de <i>C. albicans</i>	87
2.1. Determinación de la ultra-estructura de la pared celular de los mutantes....	87

• La alteración de la ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> de <i>C. albicans</i> modifica la morfología de la pared celular del hongo.....	87
2.2. Análisis de los niveles de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) expuestos en la pared celular de los mutantes en la ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> de <i>C. albicans</i>	88
• La ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> determina una mayor exposición de β -glucano en la pared celular fúngica, provocando un aumento en el reconocimiento del hongo mediado por Dectin-1.....	88
3. OBJETIVO: Analizar las consecuencias funcionales que tiene la delección de la MAPK <i>Cek1</i> de <i>C. albicans</i> sobre la respuesta inmune.....	94
3.1. Análisis de las respuestas específicas mediadas por Dectin-1 en respuesta al mutante <i>cek1</i> en células primarias humanas (hDCs y hMΦs).....	94
• La delección de <i>CEK1</i> provoca un incremento de la fagocitosis y de la susceptibilidad del hongo a los fagocitos humanos.....	94
• El mutante de delección <i>cek1</i> promueve la fosforilación de las quinasas Syk, Raf-1 y ERK, induciendo la degradación de I- κ B en hDCs y disparando la activación de AP-1 a través de Dectin-1.....	97
• La delección del gen <i>CEK1</i> provoca un incremento en la respuesta oxidativa y en la síntesis de citoquinas dependiente de Dectin-1.....	101
DISCUSIÓN.....	107
• <i>Candida albicans</i> como modelo de investigación de la infección fúngica.....	107
• La ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> como mecanismo de enmascaramiento del β -glucano: consecuencias funcionales de su alteración sobre la respuesta inmune.....	109
• El control de la infección fúngica.....	111
• La señalización intracelular mediada por Dectin-1 en respuesta a <i>Candida albicans</i>	112
• El enmascaramiento del β -glucano como mecanismo de evasión del sistema inmune.	113
• El modelo integrado de reconocimiento de <i>C. albicans</i> . Papel de los distintos ligandos de Dectin-1 en la modulación de la respuesta inmune.....	115

<ul style="list-style-type: none"> Nuevos mecanismos de protección frente a <i>C. albicans</i>: la ruta MAPK mediada por <i>CEK1</i> como posible diana terapéutica y el estado actual de las vacunas antifúngicas..... 	117
CONCLUSIONES.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	147
<ul style="list-style-type: none"> ANEXO 1: Caracterización del anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano MGD3. Patente..... ANEXO 2: Artículos publicados relacionados con la Tesis..... 	149 153

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Célula presentadora de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl10	Acrónimo de <i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
BCR	Receptor de linfocitos B
BDCA-2	Antígeno sanguíneo de células dendríticas 2
Card9	Dominio 9 de reclutamiento de caspasa
CEK1	Acrónimo de <i>Candida albicans ERK-like-1</i>
CFUs	Unidades Formadoras de Colonias
CLEC	Acrónimo de <i>C-type Lectin domain family member</i>
CLRs	Receptores de tipo lectina-C
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
Cox-2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
CR3	Receptor 3 del complemento
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLD	Dominio tipo lectina-C
DCIR	Inmunoreceptor de células dendríticas
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	Acrónimo de <i>Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin</i>
Dectin	Acrónimo de <i>Dendritic-cell-associated C-type lectin-1</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Región Fc de la inmunoglobulina humana G1, IgG1-Fc
FCA	Adyuvante completo de Freund
FcR γ	Cadena gamma del receptor Fc
FITC	Fluoresceína isotiocianato isómero I
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
h.	Horas
H ₂ O	Agua
hDC	Célula dendrítica humana derivada de monocitos
His	Histidina
hk	Matadas por calor
hM Φ	Macrófago humano derivado de monocitos
FPLC	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas
I- κ B	Inhibidor de kappa B
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
Ig κ	Cadena ligera kappa de la inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITAM	Inmunoreceptor con motivo de activación basado en tirosina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
l	Litro
LAM	Laminarina
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Dominio rico en leucina
M	Molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
Malt1	Acrónimo de <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>

MAP	Proteína activada por mitógeno
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKK/MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno
MAPKKK/MEKK	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno
MBL	Lectina de unión a manosa
MFI	Media de intensidad de fluorescencia
mg/ml	miligramo/mililitro
MGL	Acrónimo de <i>MΦ Galactose N-acetyl-galactosamine specific Lectin 1</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MICL	Receptor tipo lectina C mieloide
min.	Minutos
Mincle	Lectina tipo C inducible por macrófagos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
MR	Receptor de manosa
Myd88	Gen 88 de respuesta primaria de la diferenciación mieloide
MΦ	Macrófago
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptor tipo NOD
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
° C	Grado centígrado
pAb	Anticuerpo policlonal
Pam₂Cys	Lipopéptido diacilado
Pam₃Cys	Lipopéptido triacilado
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGN	Peptidoglicano
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
Raf-1	Acrónimo de <i>v-raf-leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RIG	Gen inducible por ácido retinoico I
RLR	Receptor tipo RIG
RLU	Unidades de luz relativas
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
sDectinFc	Proteína soluble de fusión de Dectin-1 y Fc
sDectinFlag	Proteína soluble de fusión de Dectin-1 y Flag
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SH2	Dominio 2 de homología a Src
SP	Proteína del surfactante pulmonar
SPR	Resonancia de plasmones superficiales
Syk	Tirosina quinasa de bazo
TCR	Receptor de linfocitos T
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
tGPI-mucina	Glicoinositolfosfatidil-mucina de <i>Trypanosoma</i>
T_h	Linfocito T colaborador
Thr	Treonina
TIR	Receptor <i>Toll</i> de interleuquina I
TLRs	Receptores de tipo <i>Toll</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

T_{reg}	Linfocito T regulador
TRIF	Proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón-β
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U/ml	Unidades/mililitro
UV	Luz ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
wt	Silvestre
ZYM	Zymosan
μ	Micro

SUMMARY

SUMMARY

Candida albicans is a major agent of opportunistic infections especially among immunocompromised patients. As this yeast is a normal commensal of human microbiota, the ultimate challenge in *C. albicans* antifungal therapy is to identify novel targets to improve protective host responses to invasive candidiasis. In the work herein presented, we found that Cek1 MAP kinase blockade in *C. albicans* caused cell wall β -glucan unmasking and render the fungus “visible” to the Pathogen Recognition Receptor Dectin-1.

Innate immunity to *Candida albicans* depends upon recognition of molecular patterns on the fungal cell wall. However, masking of major components such as β -glucan seems to be a mechanism that fungi have evolved to avoid immune-cell recognition through Dectin-1-receptor. Although the role of *C. albicans* mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways as virulence determinants has been previously established in animal models, the mechanism involved in this behaviour is largely unknown. In this study we demonstrate that disruption of the *C. albicans* ERK-like-1 (*CEK1*)-mediated MAPK pathway causes enhanced cell-wall β -glucan exposure triggering immune responses more efficiently than wild-type yeast, as measured by Dectin-1-mediated specific binding, human dendritic cell (hDC)- and macrophage-mediated phagocytosis, killing and activation of intracellular signaling-pathways. At the molecular level, disruption of *CEK1* resulted in altered spleen tyrosine kinase (Syk)-, Raf-1- and ERK1/2- activation together with I- κ B degradation on hDC and increased Dectin-1-dependent AP-1 activation on transfected cells. In addition, concurring with these altered pathways, we detected increased reactive oxygen species production and cytokine secretion.

In conclusion, this study demonstrates that the *CEK1*-mediated MAPK pathway is involved in β -glucan exposure in a fungal pathogen, hence influencing Dectin-1-dependent immune-cell recognition. Consequently, drugs targeting this fungal-conserved MAP kinase pathway may provide new tools for fighting fungal infections, and help lay the groundwork for the development of novel anti-*Candida* strategies.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE

1.1.- Inmunidad innata y adaptativa.

La inmunidad es la capacidad del organismo para combatir específicamente la infección. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, encargado de la defensa contra agentes extraños, fundamentalmente infecciosos, cuya respuesta coordinada es denominada respuesta inmune. La respuesta inmune permite el reconocimiento del patógeno como agente extraño y activa una serie de componentes celulares y moleculares que llevan a la eliminación del patógeno a la vez que mantienen la tolerancia a lo propio. Durante la respuesta inmune actúan de forma concertada los componentes de la inmunidad innata, que constituyen la primera línea de defensa, y los de la inmunidad adaptativa, posteriores en el tiempo e inducidos por los primeros (Tabla 1).

Principales diferencias entre la Inmunidad Innata y la Adaptativa		
	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
Tiempo de respuesta	Temprana (horas)	Tardía (días). Periodo de latencia entre la exposición y la respuesta máxima
Especificidad	Limitada y fija	Muy amplia; aumenta durante el curso de la respuesta inmunitaria
Componentes principales	Barreras (p.ej., piel, mucosas); complemento; fagocitos y NKs	Linfocitos B y T; anticuerpos
Receptores	Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), codificados en la línea germinal y de expresión constitutiva	Receptores específicos de antígeno (producidos por recombinación somática de segmentos génicos; BCR y TCR)
Reconocimiento/ Ligandos	Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), evolutivamente conservados	Amplia variedad de estructuras moleculares (proteínas, péptidos)
Memoria	La exposición al antígeno no induce memoria inmunológica. La respuesta a infecciones repetidas es idéntica a la primaria	La exposición al antígeno induce memoria inmunológica. La respuesta a infecciones repetidas es mucho más rápida que la respuesta primaria
Evolución	Conservada a nivel evolutivo desde plantas a animales	Exclusiva de vertebrados

Tabla 1: El sistema inmune, características principales de la inmunidad innata y la adaptativa.

La respuesta inmune innata constituye un mecanismo de defensa del huésped que tiene lugar principalmente en las zonas expuestas a los patógenos como son la piel y las mucosas. Entre las células implicadas en este tipo de inmunidad, se encuentran las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas), las células asesinas naturales o NKs (*Natural Killer*) y otras células no hematopoyéticas como las epiteliales y las endoteliales. Entre los componentes humorales se encuentran las proteínas circulantes efectoras, como las del sistema del complemento, las citoquinas y las quimioquinas. Aunque la mayoría de los agentes patógenos suelen controlarse antes de que se produzca una infección declarada, en caso de que la infección se consolide, la inmunidad innata provee además un conjunto de señales indispensables para la activación de la subsecuente respuesta adaptativa. La respuesta inmune adaptativa es altamente específica e incluye componentes humorales (anticuerpos) y celulares (linfocitos T y B). Los linfocitos T reconocen específicamente el antígeno (Ag), siendo capaces de responder directamente (inmunidad celular), o a través de la activación de los linfocitos B que sintetizan los anticuerpos capaces de reaccionar con el Ag, ayudando a su destrucción o neutralización (inmunidad humoral). La especificidad de reconocimiento de la inmunidad adaptativa se basa en un amplio repertorio de receptores generados por reordenamientos génicos y expresados en los linfocitos (receptor de linfocitos T o TCR e inmunoglobulinas de los linfocitos B). Este sistema antígeno-específico induce la diferenciación de distintos subtipos de linfocitos T efectores en función del patógeno encontrado, así como la de las células T de memoria, un mecanismo de memoria inmunológica por el cual, ante un segundo encuentro con el mismo patógeno, la respuesta es más rápida y eficiente (Figura 1).

La respuesta inmune innata ha sido tradicionalmente considerada una respuesta inespecífica y limitada a contener la infección mediante mecanismos primitivos, dando tiempo al huésped para que ponga en marcha la inmunidad adaptativa. Sin embargo, el descubrimiento a mediados de los años noventa de los receptores tipo *Toll* (*Toll Like Receptors*, TLRs) supuso una auténtica revolución en la forma de entender y analizar la activación y el reconocimiento de los microorganismos por parte del sistema inmune innato. En los últimos años, el estudio de esta rama del sistema inmune ha cobrado mucho interés, dada su capacidad de distinguir una gran variedad de patógenos a través de unos pocos receptores evolutivamente conservados, capaces de activar mecanismos de inmunidad innata a través de señales muy específicas. La visión del sistema inmune innato ya no es tan simplista. Este sistema no sólo reconoce un amplio rango de

microorganismos, sino que inicia y modula la posterior respuesta inmune adaptativa mediante las células presentadoras de antígeno (*Antigen Presenting Cells*, APCs), especialmente a través de las células dendríticas (DCs).

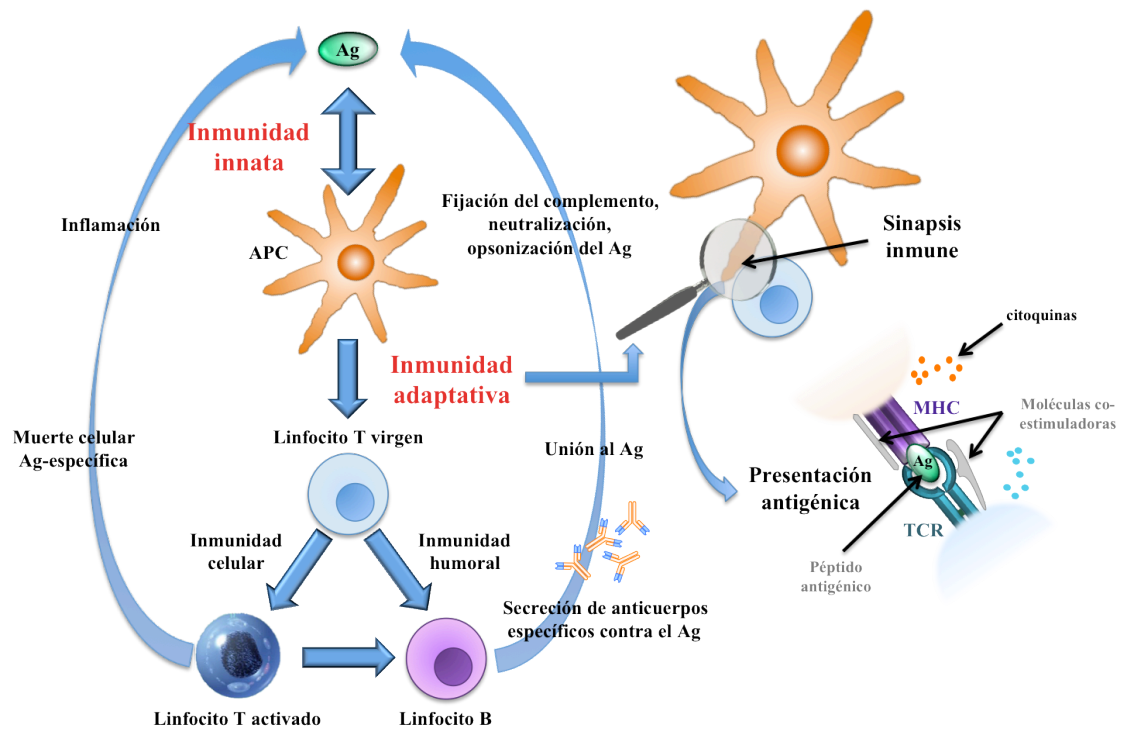


Figura 1: Panorámica de la respuesta inmune. La inmunidad innata es esencial para el correcto funcionamiento de la inmunidad adaptativa. Una vez que el antígeno (Ag) ha sido reconocido por las células presentadoras de antígeno (APC), tiene lugar un procesamiento intracelular del mismo que culmina con la presentación antigénica a las células T, en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T vírgenes (no activados) no reconocen antígenos de forma directa, sino que requieren de su fragmentación en pequeños péptidos unidos a moléculas del MHC a través del receptor de células T (TCR), lo que en presencia de diversas señales co-estimuladoras (moléculas y citoquinas), llevará a la activación del linfocito y a su posterior proliferación y diferenciación al subtipo de célula efectora o colaboradora correspondiente (inmunidad celular) y/o a la activación de los linfocitos B encargados de la síntesis de anticuerpos específicos contra el Ag (inmunidad humoral).

1.2.- Células dendríticas y macrófagos.

Las primeras células encargadas del reconocimiento microbiano son los neutrófilos y los monocitos circulantes, mientras que en los tejidos, este reconocimiento ocurre principalmente a través de las APCs, entre las que se incluyen los macrófagos (MΦs), las células dendríticas (DCs) y los linfocitos B. Estas células expresan un variado repertorio de receptores capaces de reconocer, capturar e internalizar antígenos

extraños, facilitando su procesamiento y posterior exposición en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) para su presentación a los linfocitos T, permitiendo así una correcta respuesta inmune y el desarrollo de la memoria inmunológica (Figura 1). Las DCs y los MΦs se encuentran principalmente situados en los sitios de entrada de patógenos, siendo por tanto indispensables para el inicio de la respuesta inmune innata. Su capacidad para discriminar los antígenos “no propios” recae en receptores expresados en su superficie celular. Es precisamente el mosaico de receptores expresado en cada subtipo celular y en cada microambiente particular el que determina el tipo de respuesta desencadenada.

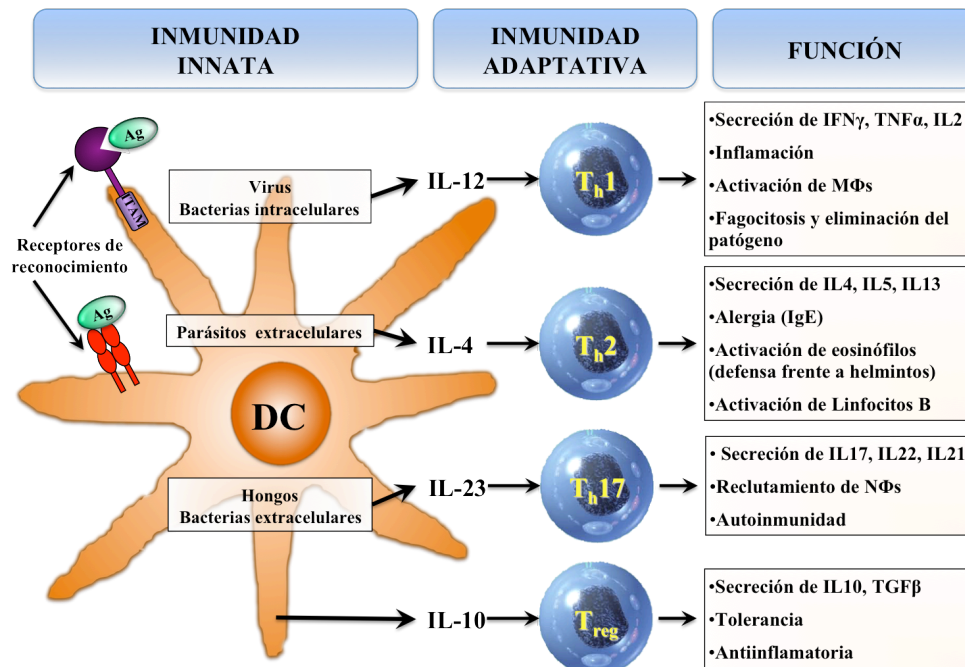


Figura 2: Diferenciación de linfocitos T dirigida por las DCs. Las DC inmaduras reconocen antígenos a través de sus receptores de reconocimiento, lo que provoca su maduración y posterior migración a los nódulos linfáticos, donde encuentran a los linfocitos T y en función del antígeno presentado, estos son diferenciados a distintos tipos de células efectoras o reguladoras que desarrollan diferentes papeles en la respuesta inmune desencadenada contra el patógeno. Th1, Th2, Th17 o Treg: células T-colaboradoras 1, 2, secretoras de IL-17 o reguladoras, respectivamente. NΦs: neutrófilos.

Las DCs son un grupo de leucocitos migratorios derivados de la médula ósea, especializados en la captación, transporte, procesamiento y presentación de antígenos a las células T (Steinman, 1991). Estas células pueblan los órganos linfoides, incluyendo el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, así como casi todos los demás tejidos y

órganos no linfoides (Romani et al., 2002). En su estado inmaduro actúan como centinelas en los tejidos periféricos, donde adquieren el Ag, iniciando entonces su migración a los ganglios linfáticos. El Ag capturado es procesado y los péptidos generados son presentados en la superficie celular a través de las moléculas del MHC a los linfocitos T vírgenes (Figura 1). Las DCs tienen la capacidad de dirigir la diferenciación de las células T colaboradoras (*T helper*, T_h) a distintos tipos de células efectoras: T_{h1} , T_{h2} o T_{h17} , en función del patógeno detectado así como a células T supresoras o reguladoras (T_{regs}) implicadas en tolerancia (Figura 2). La gran plasticidad de estas células viene determinada por el patrón de expresión de sus numerosos receptores de reconocimiento, que a su vez depende del subtipo de DC, es decir de su localización, linaje y función especializada, lo que les permite discriminar diversos morfotipos microbianos, convirtiéndolas en uno los principales enlaces entre la inmunidad innata y la adaptativa.

2. INMUNIDAD ANTIFÚNGICA: RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS

La interacción huésped-microbio es esencial para muchos aspectos de la fisiología de ambos organismos. A pesar de la relación mutua a lo largo de todo el periodo coevolutivo, las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda mayor causa de muerte a nivel global (Ishii et al., 2008). Aunque se estima que existen aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos (Holland and Vinh, 2009), sólo una mínima parte de ellas pueden considerarse verdaderamente patogénicas para los individuos sanos. En las últimas décadas, la prevalencia de situaciones de inmunodepresión en individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), transplantados, con cáncer, o tratados con agentes inmunosupresores, han llevado a un repunte en la incidencia de infecciones por patógenos fúngicos oportunistas como por ejemplo especies de *Candida* y *Aspergillus*.

Los hongos se caracterizan por su habilidad de existir en diferentes formas celulares (blastoesporas, hifas, pseudohifas, conidios, etc.) y por la capacidad de cambiar de unas a otras a lo largo de la infección (Romani, 2004). Para aquellos hongos que son comensales, hay otras dos características destacables que son, la alta efectividad y sofisticación de sus estrategias de evasión del sistema inmune, evolucionadas para permitirles sobrevivir en el ambiente hostil del huésped, y la estimulación antigénica al

que someten al mismo, mantenida a lo largo del tiempo y que provoca fenómenos de tolerancia. Existe por tanto un delicado equilibrio entre el comensalismo y la infectividad, hábilmente mantenido por el hongo para soslayar las estrategias del huésped que tratan de limitar su infectividad.

2.1.- Receptores de reconocimiento de patrones, PRRs.

Hace veintiún años, Janeway C.A. Jr. publicaba su teoría sobre los mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata que revolucionaría el concepto del sistema inmune (Janeway, 1989). Dicha teoría, además de sugerir el mecanismo general de la respuesta inmune innata para el reconocimiento de lo propio *versus* lo no-propio, proporcionaba un concepto integrador de los dos tipos de inmunidad, la innata y la adaptativa. Desde entonces, un gran número de estudios han puesto de relieve la gran importancia que tienen los receptores específicos del sistema inmune innato en el reconocimiento de las infecciones microbianas. Estos receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) se expresan de forma constitutiva y son capaces de identificar moléculas muy conservadas evolutivamente que se encuentran en la superficie de los patógenos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs). Dichos PAMPs son esenciales para la supervivencia del patógeno y por tanto son difícilmente susceptibles de ser alterados por el mismo. Los PRRs actúan como sensores capaces de reconocer al patógeno y activar la respuesta inmune innata a través de cascadas de señalización específicas, regulando de forma muy precisa la posterior respuesta inmune adaptativa (Medzhitov, 2007). El reconocimiento del microbio por parte de estos PRRs permite que las células fagocíticas, además de llevar a cabo la captación y el aniquilamiento o eliminación del patógeno, induzcan una respuesta inflamatoria. Tras esta primera respuesta inmediata, si es necesario, se activa la respuesta inmune adaptativa específica contra el patógeno concreto.

Los distintos PRRs detectan de forma específica una amplia variedad de PAMPs, muestran distintos patrones de expresión en las distintas células, activan determinadas vías de señalización y dan lugar a respuestas muy concretas frente a los distintos patógenos reconocidos (Akira et al., 2006). El reconocimiento del patógeno puede ocurrir de forma directa, a través de PRRs de membrana o citoplásmicos, o bien

de forma indirecta mediante los PRRs solubles. En los mamíferos los PRRs mejor caracterizados son los TLRs (Takeda et al., 2003), localizados en la membrana plasmática y capaces de detectar componentes de la pared celular bacteriana, proteínas virales a nivel de superficie o ácidos nucleicos microbianos expuestos en vesículas como los endosomas o los fagosomas (Ishii et al., 2008). A lo largo de los últimos años, se ha demostrado que otros PRRs de tipo no-TLR como la superfamilia de los receptores tipo lectina-C (*C-type lectins*, CLR) (Geijtenbeek et al., 2004; Ishii et al., 2008), desempeñan igualmente un papel determinante en la inmunidad antifúngica. Existen también otros PRRs citoplásmicos como los receptores tipo NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain* [NOD-like receptors], NLRs) (Fritz et al., 2006) o los receptores tipo RIG-I (*Retinoic-acid-Inducible Gene I*, RLRs) (Yoneyama and Fujita, 2007), que actúan como sensores intracelulares frente a peptidoglicanos bacterianos y ácidos nucleicos virales, respectivamente.

Receptores de tipo Toll (TLRs). El primer miembro de esta familia de proteínas evolutivamente conservadas denominado *Toll*, e identificado en *Drosophila melanogaster* (Anderson et al., 1985), participa en desarrollo embrionario además de desempeñar un importante papel en la inmunidad antifúngica de la mosca adulta (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996). Estos receptores transmembrana, se caracterizan por sus dominios extracelulares que contienen varios motivos repetidos ricos en leucinas (*Leucine-Rich-Domains*, LRR) implicados en el reconocimiento del patógeno, así como un dominio intracelular homólogo al del receptor de interleuquina 1 (IL-1R), llamado TIR (*Toll Interleukin-1 Receptor*), necesario para la señalización (Medzhitov, 2001). Una característica atípica de estos PRRs es que algunos de ellos pueden reconocer varios ligandos con estructuras muy diversas y no relacionadas (Figura 3). Así por ejemplo, TLR2 es capaz de reconocer componentes bacterianos como el peptidoglicano (PGN) o los lipopéptidos triacilados (Pam₃Cys) de bacterias y micobacterias (Quesniaux et al., 2004; Travassos et al., 2004); fúngicos como el zymosan (Gantner et al., 2003); parasitarios como la glicoinositolfosfatidil-mucina de *Trypanosoma* (tGPI-mucina) (Gazzinelli et al., 2004) e incluso víricos como la proteína hemaglutinina del virus del sarampión (Bieback et al., 2002). A pesar de que se han descrito un gran número de ligandos para los distintos TLRs, la mayor parte de ellos son aún desconocidos.

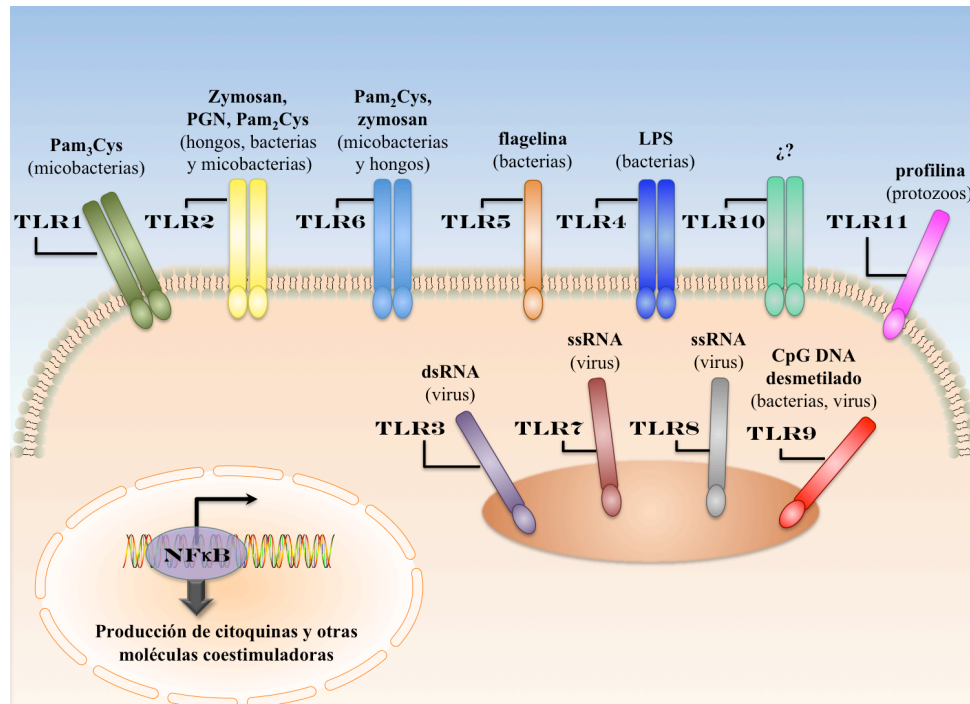


Figura 3: Miembros de la familia TLR de mamíferos y sus respectivos ligandos. La figura muestra los ligandos más comunes descritos para cada TLR. Pam₍₂₎₍₃₎Cys: lipopéptidos di- y tri-acilados, respectivamente; PGN: peptidoglicano; LPS: lipopolisacárido; dsRNA: ARN de cadena doble; ssRNA: ARN de cadena simple; CpG DNA: dinucleótidos desmetilados CpG.

Esta familia de receptores se expresa de forma predominante en APCs como las DCs y los MΦs y de forma minoritaria, en linfocitos B, algunos T e incluso en células no inmunes como los fibroblastos o las epiteliales. Pueden encontrarse asociados a membrana (TLRs 1, 2, 4, 5 y 6) o en compartimentos intracelulares (TLRs 3, 7, 8 y 9) en los que el reconocimiento del ligando (principalmente ácidos nucleicos) requiere previamente la internalización en los endosomas. Dicho reconocimiento a través de homo- o heterodímeros de TLRs, induce una cascada de señalización a través de moléculas adaptadoras como el Myd88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) o el TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β*), dando finalmente lugar a la activación de factores de transcripción como el NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*). El resultado final de esta señalización es la expresión de genes de implicados en la respuesta inflamatoria y la posterior producción de citoquinas y quimioquinas (Akira et al., 2006).

Receptores de tipo lectina-C (*C-type Lectin Receptors*, CLR). Dentro de la superfamilia de las lectinas (proteínas con capacidad de unión a azúcares), se encuentra

la familia de las lectinas de tipo-C, que se caracterizan porque todos sus miembros poseen al menos un dominio lectina de tipo-C o CTLD (*C-Type Lectin-like Domain*) en su extremo extracelular (Zelensky and Gready, 2005). Existe un amplio rango de proteínas que contienen CTLDs, implicadas en la adhesión célula-célula, en la respuesta inmune frente a patógenos, e incluso en la detección de necrosis (Cambi and Figdor, 2009; Drickamer, 1999; Sancho et al., 2009). La variedad estructural es también muy amplia, dependiendo de la presencia de uno o múltiples dominios CTLD (McGreal et al., 2004). El término “*C-type lectin*” hace referencia a un grupo de proteínas de unión a carbohidratos (*lectin*) dependientes de Ca^{2+} (*C-type*) en las que dicha actividad es llevada a cabo por el denominado dominio CRD (*Carbohydrate-Recognition Domain*) (Drickamer, 1988, 1989). A medida que fueron descubriéndose más proteínas que poseían este dominio, se vio que no todas ellas unían carbohidratos o incluso Ca^{2+} , por lo que para resolver la contradicción, se introdujo el término “*C-type lectin-like domains*” o CTLD (Drickamer, 1993, 1999; Weis et al., 1998). Drickamer *et al.* clasificaron las lectinas de tipo-C en siete subgrupos en base al orden de los distintos dominios proteicos de cada lectina (Drickamer, 1993). No obstante, esta clasificación fue revisada en 2002 dando lugar a otros siete grupos adicionales (Drickamer and Fadden, 2002) y posteriormente, se han añadido otros tres subgrupos más, lo que deja un número final de diecisiete subgrupos (Zelensky and Gready, 2005). Entre los CLRs podemos encontrar lectinas solubles, como la lectina de unión a manosa (*Mannose Binding Lectin*, MBL) (Kawasaki et al., 1983) o las proteínas del surfactante pulmonar A y D (SP-A y SP-D), o bien lectinas de membrana, subdivididas a su vez en dos grupos en función de la localización del extremo N-terminal. Las lectinas-C de tipo I, como el receptor de manosa (MR, *Mannose Receptor*), poseen el extremo N-terminal en el exterior celular y hasta diez dominios CTLD. Las de tipo II, tienen dicho extremo en el interior y pertenecen a la denominada familia del receptor de la asialoglicoproteína, que a su vez posee dos subfamilias, la de DCIR (*DC immunoreceptor*) y la de Dectin-1 (*DC-associated C-type lectin I*) (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009) (Figura 4). Dichas lectinas son las que se expresan mayoritariamente en las DCs. Se caracterizan por un corto dominio intracelular y un cuello de tamaño variable que une el CTLD a la región transmembrana, y que en la mayoría de los casos está implicado en la multimerización del receptor. Muchos de estos CLRs están implicados en la inmunidad antifúngica, como el MR, Dectin-2, DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*), las colectinas o Dectin-1. Todos estos receptores median la unión, captación y

eliminación del patógeno además de contribuir al inicio y/o la modulación de la respuesta inmune adaptativa.

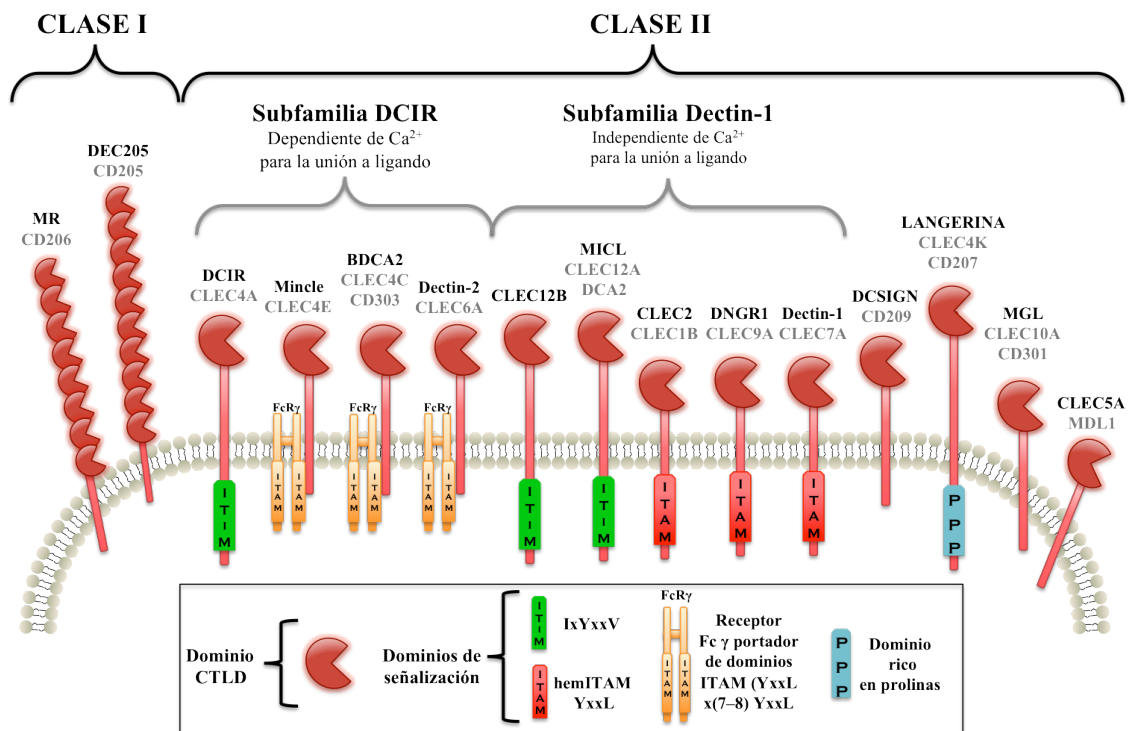


Figura 4. Receptores transmembrana tipo lectina-C que actúan como receptores de reconocimiento de patógenos. *Los nombres alternativos de las CLRs aparecen en gris claro. MR, *Mannose Receptor*; CLEC, *C-type lectin domain family member*; DCIR, *DC immunoreceptor*; Mincle, *M Φ -inducible C-type lectin*; BDCA-2, *Blood DC antigen-2*; Dectin, *DC-associated C-type lectin*; MICL, *Myeloid C-type Lectin like receptor*; DC-SIGN, *Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*; langerina, *Langerhans cell specific C-type lectin*; MGL, *M Φ Galactose N-acetyl-galactosamine specific Lectin I*; FcR γ , *Fc receptor γ -chain*; ITIM/ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor or Activation Motif*. En la parte inferior se muestra la leyenda de las imágenes utilizadas para los distintos dominios.

2.2.- Patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs.

La mayoría de los componentes de la pared celular de los patógenos fúngicos no se encuentran en los mamíferos y por tanto representan la diana ideal para el reconocimiento de lo “no propio” (Janeway, 1992). Por otro lado, el elevado grado de conservación en los PRRs de mamíferos sugiere que existen pocas variaciones o mutaciones entre los PAMPs que reconocen, y que la presión selectiva para reconocerlos ha hecho que el repertorio de PRRs expresados en las distintas células de los vertebrados se haya mantenido relativamente invariable.

PRR	PAMP FÚNGICO	Especies fúngicas que expresan el PAMP
TLR4/ DC-SIGN / DECTIN-2 / MBL / MR / SP-A / SP-D	Manano	<i>Candida albicans</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
TLR2	Fosfolipomanano	<i>Candida albicans</i>
TLR4	Glucuronoxilomanano	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida utilis</i>
Gal-3	β -(1,2)-manósidos	<i>Candida albicans</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
PTX3	Galactomanano	<i>Aspergillus fumigatus</i>
DECTIN-1 / SP-D / lactosilceramida	β -glucano	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>
TLR2 -TLR6 / PTX3	Zymosan	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
¿?	Quitina	<i>Candida albicans</i>
TLR9	CpG DNA	<i>Candida albicans</i>

Tabla 2: Principales PRRs implicados en el reconocimiento fúngico y sus respectivos PAMPs. DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*; Dectin: *DC-associated C-type lectin*; MBL: lectina de unión a manano; MR: Mannose Receptor; SP: proteínas surfactantes; Gal-3 (Mac-2): Galectina-3; PTX3: Pentraxina-3.

Mananos y manoproteínas. Estos PAMPs, que inducen preferencialmente la activación de la respuesta T_H1 , son reconocidos por numerosos PRRs (Tabla 2). Entre ellos destaca el MR, un CLR expresado en MΦs (Linehan et al., 2000; Netea et al., 2006; Stahl et al., 1978), que se ha visto asociado a TLR2 durante la estimulación con hongos como *Pneumocystis* (Tachado et al., 2007). DC-SIGN, otra lectina de tipo-C específica de DCs, puede internalizar *C. albicans* al reconocer mananos N-glicosilados expuestos en el hongo (Cambi et al., 2003; Taylor et al., 2004). Por su parte, TLR4 reconoce preferencialmente mananos O-glicosilados (Netea et al., 2006). Galectina-3, una lectina originalmente descrita por su capacidad de unir galactosa, reconoce los β -(1,2)-manósidos de *C. albicans* (Fradin et al., 2000; Kohatsu et al., 2006) y se asocia con TLR2 en MΦs (Jouault et al., 2006). Otros ejemplos de receptores de mananos, en este caso opsonizantes, lo constituyen la familia de las colectinas, CLRs solubles que tras la unión al ligando se asocian a receptores fagocíticos. Son tres las implicadas en el

reconocimiento fúngico: la MBL, proteína sérica secretada principalmente en hígado, cuya principal función es la activación de complemento, y las proteínas del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D), secretadas en los alveolos pulmonares y capaces de reconocer una amplia variedad de patógenos. Por último, otro receptor de mananos es Dectin-2, que reconoce específicamente las hifas de *C. albicans* (McGreal et al., 2006; Sato et al., 2006).

β -glucanos. En los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto que el β -glucano es el PAMP fúngico más común y una especie de “talón de Aquiles” para los hongos. Estos polisacáridos son los componentes mayoritarios de la pared celular de los hongos, aunque también se encuentran en plantas y algunas bacterias (Palma et al., 2006). Aunque Dectin-1 es el principal receptor de β -glucanos en células mieloides (Brown et al., 2003; Taylor et al., 2007), los β -glucanos pueden ser reconocidos por otros receptores como el receptor 3 del complemento, CR3 (integrina conocida también como Mac-1/CD11b/CD18) que reconoce β -(1,6)-glucanos opsonizados por iC3b (la forma inactivada del componente del complemento C3b) (Forsyth and Mathews, 2002; Forsyth et al., 1998), el SP-D, la lactosilceramida o los receptores tipo *scavenger* (Brown, 2006) (Tabla 2).

Debido al amplio repertorio de PRRs capaces de detectar el β -glucano, los hongos han tenido que desarrollar diversas estrategias para esconderlo, de forma que puedan evadir el sistema inmune, convirtiendo el enmascaramiento de β -glucano en una estrategia de virulencia básica. Diversos hongos patógenos utilizan su capacidad polimórfica para llevar a cabo dicho enmascaramiento. Además de *C. albicans* (analizada más adelante en profundidad), la detección de *Aspergillus fumigatus* mediada por Dectin-1 también depende del morfotipo del hongo (Gersuk et al., 2006; Hohl et al., 2005; Steele et al., 2005a). Las esporas metabólicamente inactivas (*resting*) no exponen β -glucano pero una vez inhaladas, comienzan a crecer, hinchándose (*swollen*) y exponiendo β -glucano en su pared. En individuos inmunocompetentes, las esporas germinantes son rápidamente fagocitadas y eliminadas por los macrófagos alveolares a la vez que se produce un reclutamiento de neutrófilos a la zona. Por el contrario, en individuos inmunodeprimidos estos conidios no son eliminados y tras germinar, las hifas comienzan invadir el tejido circundante, dando lugar a una neumonía invasiva. Es más, la relación existente entre virulencia y enmascaramiento de β -glucano es tan

estrecha que, al igual que ocurre en *C. albicans*, el tratamiento con caspofungina de *A. fumigatus* aumenta los niveles de expresión de β -glucano y por tanto las respuestas inflamatorias mediadas por Dectin-1 (Hohl et al., 2008; Lamaris et al., 2008). Otro ejemplo de evasión inmune en función de la morfología fúngica es *Histoplasma capsulatum*. Este patógeno respiratorio una vez inhalado, germina en respuesta a la temperatura corporal y comienzan a sintetizar α -(1,3)-glucano. Este polímero forma una capa en torno al β -glucano, enmascarándolo frente a Dectin-1 e impidiendo por tanto su reconocimiento. Sin embargo, cepas mutantes en la enzima α -(1,3)-glucanasa, son rápidamente detectadas por Dectin-1 (Rapple et al., 2007).

3. DECTIN-1

3.1.- Descripción, estructura y expresión de Dectin-1.

Dectin-1 fue inicialmente descrito en ratón como un receptor específico de DCs (*D*Endritic-cell-associated *C*-Type lectIN-1), que interaccionaba con un ligando endógeno de células T (Ariizumi et al., 2000). El Dectin-1 humano comparte con el de ratón un 60% de su secuencia y hasta un 71% de homología y está localizado en el agrupamiento génico clásicamente denominado Complejo *Natural Killer* o *NK-Complex* (NKC), en el brazo corto del cromosoma 12 (Hernanz-Falcon et al., 2001) (Figura 5).

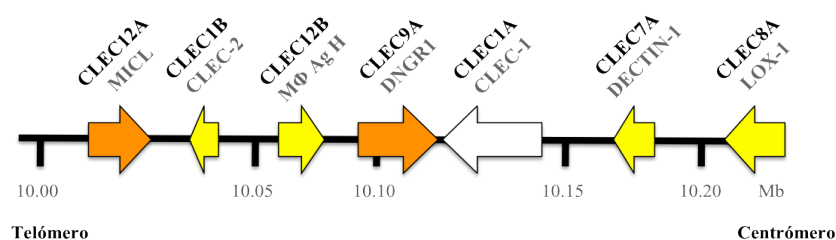


Figura 5. Esquema representativo de la organización genómica del agrupamiento génico de Dectin-1 en el denominado *NK-Complex* del brazo corto del cromosoma 12 humano. Los receptores activadores se muestran en amarillo, los inhibidores en naranja y aquellos con funciones poco estudiadas en blanco.

Dectin-1 es un receptor transmembrana de tipo II (posee el extremo N-terminal en el interior celular) independiente de Ca^{2+} para su unión a ligando, que pertenece a la

familia de las lectinas de tipo-C. Estructuralmente, consta en su extremo C-terminal (extracelular) de un único dominio CTLD que le permite reconocer carbohidratos y que se conecta a través de una pequeña región denominada cuello, y de un posterior dominio transmembrana, con una cola intracelular de unos 40 aminoácidos (Ariizumi et al., 2000; Brown and Gordon, 2001; Hermanz-Falcon et al., 2001) (Figura 6). Al contrario de lo que ocurre en ratón, el receptor humano sufre un procesamiento (*splicing*) alternativo que da lugar a dos isoformas mayoritarias (A y B) y seis minoritarias (C-H) en un proceso dependiente del tipo celular. Las isoformas mayoritarias difieren en la presencia o no del cuello y son las únicas capaces de reconocer β -glucanos (Willment et al., 2001) (Figura 6).

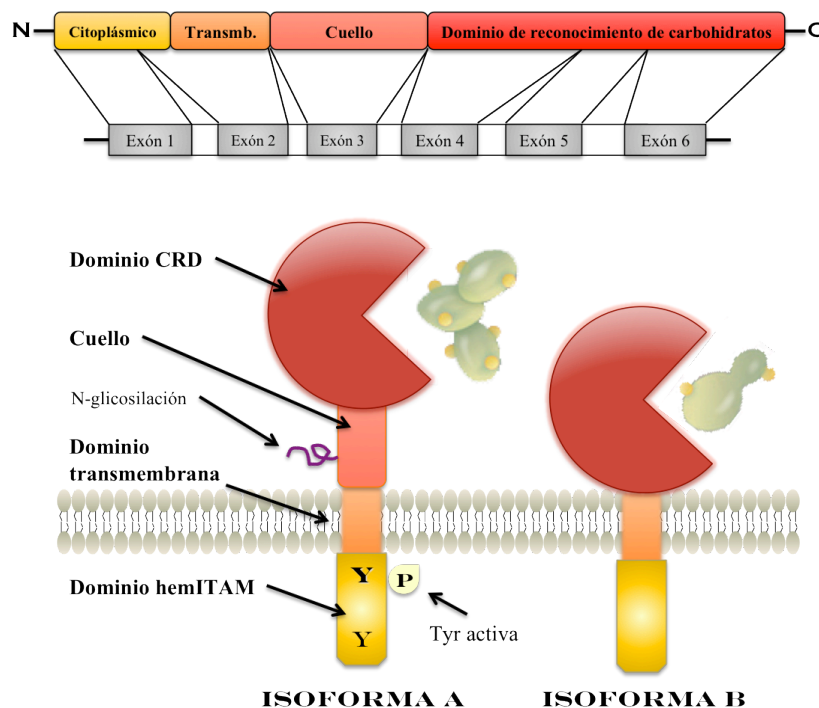


Figura 6: Estructura del gen Dectin-1 humano y de las isoformas mayoritarias a las que da lugar. En la parte superior de la figura se muestra la estructura del gen que codifica para Dectin-1 así como sus distintos exones y en la parte inferior, la estructura de las dos isoformas mayoritarias generadas tras el procesamiento alternativo del gen. El dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) está en la región extracelular en C-terminal y se une mediante un dominio transmembrana a la región N-terminal que posee el motivo tipo ITAM de señalización. Sólo en la isoforma completa (A), existe una región denominada cuello entre el CRD y el dominio transmembrana que presenta en humanos un sitio de N-glicosilación.

Tan sólo la isoforma A del Dectin-1 humano posee un sitio de N-glicosilación en el cuello, que contribuye a su expresión en superficie y a su función; por el contrario

en ratón, ambas isoformas contienen dos sitios de N-glicosilación en el CTLD. En ambas especies la isoforma B es la mayoritaria, sin embargo, se ha demostrado que a bajas temperaturas esta isoforma se une con baja afinidad a zymosan (Heinsbroek et al., 2006), probablemente indicando su diferente funcionalidad a la hora de regular la respuesta al ligando. Del resto de isoformas C-H se han realizado pocos estudios que apuntan que son formas solubles no secretadas que se encuentran en el citosol (Heinsbroek et al., 2006; Xie et al., 2006). La estructura del dominio CTLD de Dectin-1 ha sido determinada y diversos análisis mutacionales han indicado que hay dos residuos (Trp221 y His223) esenciales para la unión al β -glucano y que ambos se encuentran flanqueando un hueco del CTLD que podría ser el sitio de unión a carbohidratos (Adachi et al., 2004; Brown et al., 2007). Dichos estudios sugieren también que la unión cooperativa de dímeros de Dectin-1 une de forma más eficiente β -glucano. El receptor humano es además capaz de reconocer linfocitos T (Ariizumi et al., 2000) mediante un sitio distinto del CTLD (Brown and Gordon, 2001), aunque hasta ahora no se ha identificado dicho ligando endógeno.

En cuanto a su expresión, aunque inicialmente se describió como exclusivo de DCs, en ratón, Dectin-1 está ampliamente expresado en los tejidos, localizándose principalmente en células del linaje mieloide como neutrófilos, M Φ s alveolares e inflamatorios y de forma residual en M Φ s residentes; también se expresa en DCs, en algunos subtipos de linfocitos T (Taylor et al., 2002) e incluso en la microglía de cerebro (Shah et al., 2008). Por su parte, el receptor humano se expresa en estas mismas células y ha sido también detectado en eosinófilos y en algunos subtipos de linfocitos B sin que se conozca aún su significado funcional (Czop and Kay, 1991; Willment et al., 2005). Existen distintos estímulos que regulan la expresión de Dectin-1. El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) así como las interleuquinas IL-4 e IL-13 asociadas con la ruta alternativa de activación de M Φ (M Φ , M2) aumentan dicha expresión, mientras que por el contrario, la IL-10, el lipopolisacárido (LPS) o la dexametasona la disminuyen (Willment et al., 2003). Los monocitos expresan ambas isoformas, pero durante la maduración hacia M Φ , los niveles de expresión de la isoforma A van disminuyendo a lo largo del tiempo. Las DCs inmaduras expresan niveles relativamente altos de ambas isoformas, sin embargo, esta expresión se pierde cuando la DC madura en respuesta a LPS (Willment et al., 2005).

3.2.- Ligandos, señalización y respuestas controladas por Dectin-1.

Aunque ya en 1986 Janusz *et al.* hablaban de un receptor para β -glucanos en monocitos humanos (Janusz *et al.*, 1986) y Czop *et al.* describían su estructura en 1991 (Czop and Kay, 1991), no fue hasta 2001 cuando Brown *et al.* rastreando una librería de expresión de cDNA de macrófagos, demostraron que Dectin-1 se unía a un compuesto rico en glucanos denominado zymosan, así como al hongo *Candida albicans* (Brown and Gordon, 2001), identificando a Dectin-1 como el receptor de β -(1,3)- y β -(1,6)-glucanos. Estudios posteriores han determinado el β -(1,3)-glucano como el ligando específico de Dectin-1 (Palma *et al.*, 2006). Este PAMP representa más del 50% de las paredes de los hongos. De acuerdo con esto, Dectin-1 se ha visto implicado en el reconocimiento de numerosos patógenos fúngicos como *Candida albicans* (Gantner *et al.*, 2005; Janusz *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (Giaimis *et al.*, 1993), *Coccidioides posadasii* (Viriyakosol *et al.*, 2005), *Pneumocystis carinii* (Steele *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2005b), *Aspergillus fumigatus* (Gersuk *et al.*, 2006; Hohl *et al.*, 2005) o *Penicillium marneffei* (Nakamura *et al.*, 2008). Recientemente, Dectin-1 ha sido implicado también a en el reconocimiento de micobacterias aunque se desconoce el(los) ligando(s) reconocido(s) (Rothfuchs *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008; Yadav and Schorey, 2006). Además, estudios realizados con líneas celulares, han puesto de manifiesto que Dectin-1 puede reconocer células apoptóticas (Weck *et al.*, 2008) y diversas evidencias sugieren la existencia de ligandos endógenos aún por identificar, que revelarían una función homeostática para este receptor.

Una de las principales características de este PRR es su capacidad de señalización a través de su dominio tipo ITAM (*Immune-Tyrosine Activation Motif*) implicado en activación celular (Brown *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005). Este dominio, asociado clásicamente a la señalización vía receptores linfocitarios (TCR y BCR), así como a receptores Fc (Underhill and Goodridge, 2007), se ha denominado en el caso de Dectin-1 hemITAM, ya que su tirosina N-terminal reside en un contexto YxxxL en lugar del ITAM consenso YxxL. Sin embargo, al igual que ocurre en los otros receptores antigénicos, tras la unión del ligando este motivo se fosforila en tirosina (Tyr) a través de quinasas de la familia de las Src, permitiendo el reclutamiento de la tirosina quinasa de bazo (*Spleen Tyrosine Kinase*, Syk), que se une a través de sus dos dominios de homología a Src 2 (*Src Homology 2*, SH2) e inicia una cascada de señalización intracelular (Figura 7). La interacción de Syk y Dectin-1 es peculiar ya que

sólo se ve envuelta una de las dos Tyr del dominio, concretamente la Tyr proximal. Se ha propuesto por tanto que Syk una cada uno de sus dominios SH2 a un monómero de Dectin-1 (Rogers et al., 2005) al igual que ocurre con CLEC-2 (CLEC1B), una lectina expresada en plaquetas y localizada en el complejo génico NK (Figura 5), que tiene un hemITAM idéntico al de Dectin-1 y señala de manera similar (Fuller et al., 2007).

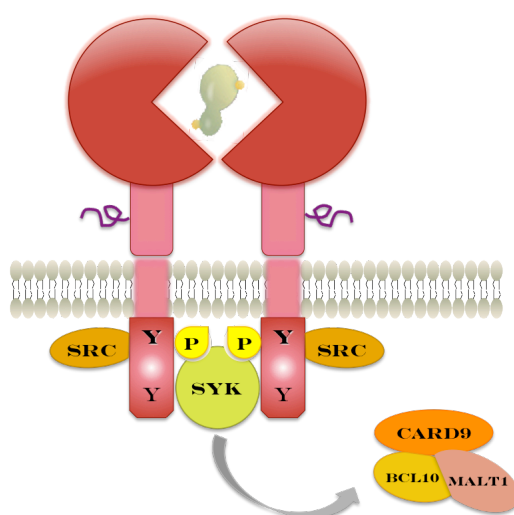


Figura 7. Estructura del dominio hemITAM de Dectin-1 y su mecanismo de señalización independiente de TLRs a través de Syk. El dominio citoplásmico de Dectin-1 sólo requiere la fosforilación (por las quinasas Src) de la tirosina (Tyr, Y) proximal para señalar vía Syk. El modelo hemITAM propone que los dos dominios SH2 de Syk unen dos Tyr fosforiladas de dos monómeros de Dectin-1. Card9 junto con el complejo Bcl10-Malt1 actúa como intermediario crítico entre la fosforilación de Syk y la posterior activación de NF- κ B que da lugar a la producción de citoquinas independientemente de los TLRs.

A pesar de la peculiaridad de la secuencia ITAM de Dectin-1, la señalización desencadenada tras la unión de Dectin-1 a su ligando es similar a la de los ITAMs convencionales. En el caso de la vía Dectin-1/Syk, en lugar de transducir a través de Carma1 como ocurre en el TCR y el BCR, es necesaria la participación de Card9 (*Caspase recruitment domain 9*), una proteína adaptadora hasta hace poco tiempo considerada exclusiva de la inmunidad adaptativa (Goodridge et al., 2009a; Gross et al., 2006; Hara et al., 2007; LeibundGut-Landmann et al., 2007). También es necesaria la activación de numerosas MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) y factores de transcripción como NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) y NF- κ B (Goodridge et al., 2007; Rogers et al., 2005; Slack et al., 2007). En resumen, una vez que Dectin-1 reconoce su ligando, su Tyr proximal es fosforilada por las quinasas Src, y Syk se une al

hemITAM, induciendo que Card9 se una directamente al complejo Bcl10-Malt1 (*B-cell leukemia/lymphoma 10* y *Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*, respectivamente), activando NF- κ B y controlando por tanto la inmunidad innata antifúngica (Gross et al., 2006) (Figura 7).

La señalización a través de Dectin-1 controla diversas respuestas inmunes como la fagocitosis, la respuesta oxidativa, la degranulación de los neutrófilos, la eliminación (*killing*) del patógeno, así como la producción de mediadores lipídicos inflamatorios y diversas citoquinas y quimioquinas que reclutan y coordinan la activación de muchas otras células inmunes (Figura 8). Aunque la fagocitosis del hongo está mediada por receptores opsonizantes y no opsonizantes, la activación del complemento juega un papel minoritario, importante para la quimiotaxis y la opsonización del hongo, pero no para la lisis, ya que la pared celular lo impide (Kozel, 1996). Los TLRs no median la fagocitosis, y el MR parece tener un papel posterior en el fagosoma, pero no en la propia fagocitosis, lo que convierte a Dectin-1 en el principal receptor no opsonizante implicado en la captación del hongo (Heinsbroek et al., 2008). Tras la fagocitosis, la acción fungicida de Dectin-1 contra *C. albicans* ocurre a través del denominado “estallido respiratorio” (*respiratory burst*), a través de la activación del complejo oxidasa-dependiente de NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) (Donini et al., 2007). Esta acción fungicida puede verse incrementada por la sinergia con TLR2 (Gantner et al., 2003; Kennedy et al., 2007). En cuanto a la producción de citoquinas, Dectin-1 controla la inducción de muchas de ellas, pero se podría resumir diciendo que la principal respuesta independiente de TLRs desencadenada por Dectin-1 tras el reconocimiento de β -glucano, es la secreción de IL-10 en las DCs (Rogers et al., 2005) y la activación de la respuesta oxidativa en M Φ s (Underhill et al., 2005). Además, la capacidad de Dectin-1 de inducir la maduración de las DCs y la producción de citoquinas como IL-23, pueden acoplar la inmunidad innata y adaptativa de forma independiente de los TLRs (LeibundGut-Landmann et al., 2007). La señalización vía Dectin-1 es suficiente para muchas de estas respuestas mientras otras, como la activación de la respuesta oxidativa o la producción de citoquinas proinflamatorias requieren la sinergia con la señalización vía Myd88 de los TLRs (Brown, 2006; Dennehy et al., 2008). En cualquier caso, Dectin-1 y los TLRs colaboran estrechamente para inducir muchas de las respuestas antifúngicas, como la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF α) y la IL-12p40 en M Φ s o la

de IL-2 en DCs. Más aún, dado el alto grado de similitud entre otras lectinas de tipo C y Dectin-1 en lo que se refiere a sus dominios de señalización, es muy probable que existan otros PRRs de tipo no-TLR capaces de señalizar de forma independiente e incluso sinérgica.

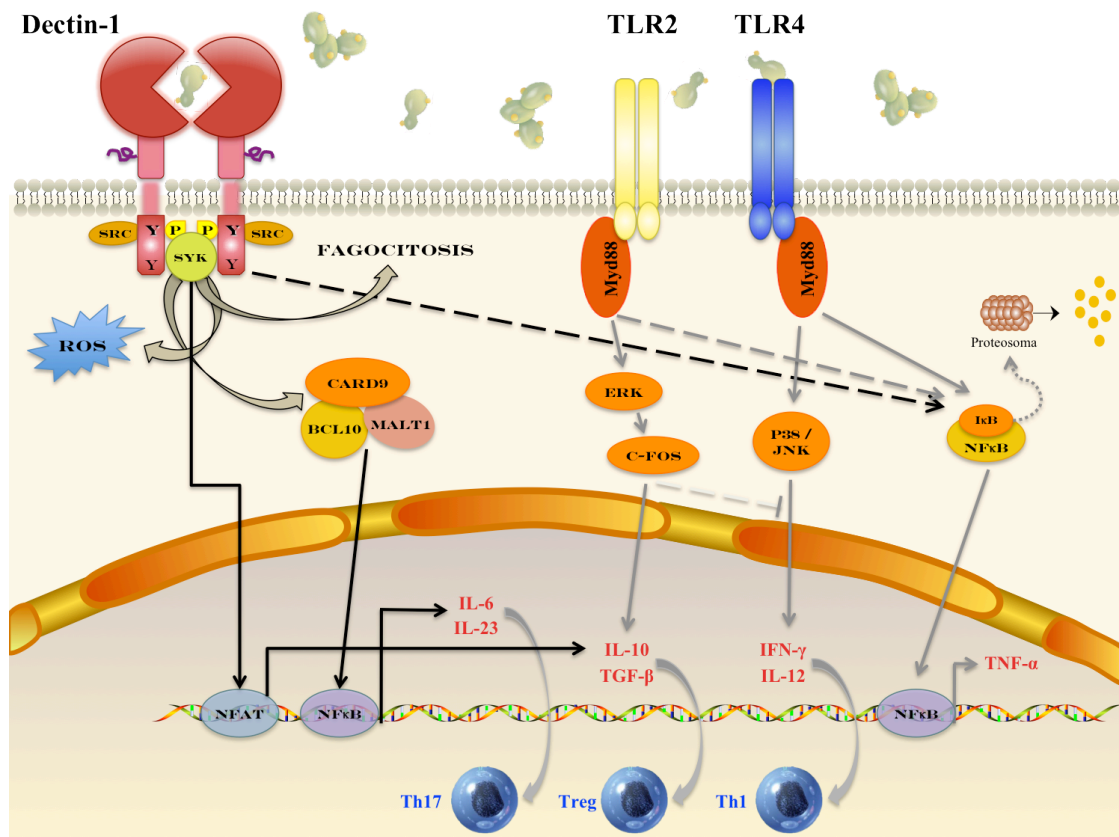


Figura 8. Principales vías de señalización de Dectin-1. Dectin-1, una vez unido a β -(1,3)-glucano, activa la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de las familias de quinasas Syk y Src. En las DCs, NF- κ B es activado a través del complejo CARD9/Bcl10/Malt1. Dectin-1 colabora con los TLRs en la inducción de la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias activando NF- κ B, y de forma independiente, activando factores de transcripción como NFAT, que coordinan la inducción de genes inflamatorios.

Además de la activación de la denominada vía canónica o clásica de NF- κ B (p65 y c-Rel), Dectin-1 es el primer PRR capaz de activar también la vía alternativa o no canónica de NF- κ B (RelB-p52) a través de Raf-1 (*v-raf-leukemia viral oncogene homolog 1*) (Gringhuis et al., 2009). Por otra parte, la inducción de citoquinas producida por la activación de Dectin-1, se ve regulada también por numerosas MAPK como ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*), p38 o JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*)

(Goodridge et al., 2009a; LeibundGut-Landmann et al., 2007; Olsson and Sundler, 2007; Slack et al., 2007). Igualmente, se ha descrito que Dectin-1 es capaz de activar el factor de transcripción NFAT (asociado tradicionalmente con la respuesta inmune adaptativa) en MΦs y DCs en respuesta a zymosan y/o *C. albicans* (Goodridge et al., 2007), controlando de esta manera la producción de ciclooxigenasa 2 (Cox-2) y prostaglandinas en MΦs y la inducción de IL-2, IL-10, IL-12p70 e IL-23 en DCs. Por el contrario, la activación de NFAT no afecta a la producción de TNF-α o IL-6, lo que indica que esta vía de señalización tiene un efecto selectivo en el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

La habilidad de los β-glucanos para inducir todas estas respuestas celulares es además dependiente del tipo celular (Tabla 3). Por ejemplo en macrófagos los β-glucanos particulados purificados son incapaces de estimular la producción de TNFα sin coestimular los TLRs (Dennehy et al., 2008), sin embargo en las DCs, el β-glucano por sí sólo es suficiente para disparar la producción de esta citoquina (LeibundGut-Landmann et al., 2007). Rosas *et al.* proponen que estas diferencias pueden deberse, al menos en parte, a la fagocitosis y la acción de citoquinas como el GM-CSF (Rosas et al., 2008). Los datos de este y otros autores (Goodridge et al., 2009a) parecen explicar la aparente inconsistencia entre algunos de los estudios publicados, indicando que existe otro nivel de regulación de la señalización vía Dectin-1 a través del cual, la respuesta específica dependería de los programas celulares y de los estímulos ambientales. Además, se ha sugerido la posibilidad de que exista un inhibidor de la ruta de señalización de Dectin-1 en las células que parecen no responder a su estimulación. Concretamente, el candidato señalado es la tetraspanina CD37 (Goodridge et al., 2009a) que ha sido previamente implicada en la interacción con Dectin-1 y la regulación de la secreción de citoquinas (Meyer-Wentrup et al., 2007). CD37 podría estar secuestrando a Dectin-1 en un microdominio que modularía de forma selectiva el reclutamiento de las moléculas señalizadoras que están por debajo de CARD9. Aunque todas las vías de señalización descritas en colaboración con los TLRs o controladas de forma independiente por Dectin-1 se han visto implicadas en el reconocimiento de componentes aislados o derivados de hongos, no se ha comprobado que estos mismos mecanismos se activen durante el reconocimiento *in vivo* de patógenos fúngicos. La mayor parte de los estudios realizados con Dectin-1 se han llevado a cabo usando zymosan, un compuesto obtenido a partir de la pared celular de *S. cerevisiae* que no

solo contiene β -glucano, sino también quitina, mananos y otras proteínas que activan otros PRRs además de Dectin-1. Por otra parte, la afinidad de unión al β -glucano ha demostrado ser muy variable en función del tamaño y del número de ramificaciones del glucano (Adams et al., 2008) y hay estudios que demuestran que el tamaño del glucano modifica la respuesta mediada por Dectin-1 (Brown et al., 2003; Yoshitomi et al., 2005) (Tabla 3). En cualquier caso, ni el zymosan ni ninguno de los ligandos particulados usados simulan correctamente el contexto real que encuentra Dectin-1 en una infección fúngica, y esta puede ser la razón de las diferentes capacidades estimuladoras de los ligandos clásicamente usados.

Principales factores que determinan la respuesta mediada por Dectin-1		
Pureza, estructura y naturaleza física del ligando	β -glucanos particulados	<ul style="list-style-type: none"> Glu-mp: micropartículas solubles de β-(1,3)-D-glucano, derivado de <i>S. cerevisiae</i> (3 μm) Curdlan: β-(1,3)-glucano derivado de <i>Alcaligenes faecalis</i> (0.2 mm)
	Zymosan: polisacárido obtenido a partir de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> rico en β -glucano, pero que también contiene manano y proteínas (quitina). (~ 3 μ m)	
	Blastoesporas de <i>C. albicans</i> (5-8 μ m)	<ul style="list-style-type: none"> vivas matadas por calor inactivadas por luz UV
Subtipo celular, especie (humano/ratón) y estado de activación de la célula estimulada	<ul style="list-style-type: none"> Macrófagos (peritoneales, alveolares, pre-activados con tioglicolato) Células dendríticas (derivadas de médula ósea [BMDDC], derivadas de monocitos [MDDC]) Microglía (Sistema nervioso central) 	

Tabla 3: Factores determinantes del tipo de respuesta mediada por Dectin-1. La fila superior muestra los distintos ligandos de Dectin-1 clásicamente usados, su estructura, así como su procedencia. En la fila inferior se muestran los distintos subtipos celulares en los que se expresa Dectin-1 y que determinan el tipo de respuesta desencadenada frente al patógeno.

3.3.- Función de Dectin-1 en el control de la infección fúngica.

El control inicial de la infección fúngica tiene lugar a través de la fagocitosis, durante la cual existe un aumento en el consumo de glucosa y oxígeno, que da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Esto, unido a la lisis enzimática que ocurre en el fagolisosoma, da lugar a la destrucción del patógeno. Los TLRs son entonces reclutados a los fagosomas donde se encargan de la

detección de las partículas fúngicas y de la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, así como de la producción especies reactivas de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS). Es decir, los TLRs no son responsables de la fagocitosis y la producción de ROS, sino que el principal receptor antifúngico fagocítico es Dectin-1 (Brown et al., 2002; Janusz et al., 1986; Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007). No obstante, los MΦs deficientes en Dectin-1 son también capaces de reconocer hongos (Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007), lo que indica que existen otros PRRs que también participan en el proceso de reconocimiento y fagocitosis. En relación con este tema, un reciente estudio ha demostrado que Dectin-1 es el principal receptor fúngico no opsonizante, pero que tanto este receptor como el CR3, se acumulan en el sitio de entrada del patógeno, mientras que el MR se acumula posteriormente en los fagosomas que contienen *C. albicans*, induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias (Heinsbroek et al., 2008). Es decir, los PRRs actuarían de forma secuencial en el proceso de captación y eliminación del hongo, y la contribución de cada uno de ellos dependería de su nivel de expresión en cada tipo de célula fagocítica, así como de la especie del hongo y de su morfotipo, sin olvidar que hasta el momento, todos los estudios realizados señalan a Dectin-1 como el receptor fagocítico más eficiente para los hongos que expresan β -glucano en sus paredes celulares.

Tras la fagocitosis, comienzan a activarse una serie de señales intracelulares que controlan la transcripción de diversos genes implicados en la respuesta frente al patógeno. La activación de Dectin-1 en DCs, polariza la posterior respuesta inmune adaptativa hacia una respuesta de tipo T_H17 gracias a la producción de IL-23 (Gerosa et al., 2008; LeibundGut-Landmann et al., 2007). Sin embargo, esta polarización de la respuesta adaptativa parece ser variable y dependiente del contexto. Dos grupos independientes han generado ratones deficientes para Dectin-1 (Dectin-1^{-/-}), obteniendo datos contradictorios en cuanto a la susceptibilidad a la invasión fúngica. Saijo *et al.* (Saijo et al., 2007) exponen que Dectin-1 es necesario para el control de la infección por *P. carinii*, pero no por *C. albicans*. Estos autores demuestran que *in vitro*, la producción de citoquinas en respuesta a β -glucano disminuye drásticamente en DCs y en MΦs deficientes en Dectin-1. Sin embargo *in vivo*, los ratones Dectin-1^{-/-} son más susceptibles que los ratones silvestres a la infección por *P. carinii*, e igualmente susceptibles a la infección por *C. albicans*. Además, la producción de citoquinas es igual en ambos tipos de ratones, mientras que la producción de ROS se ve claramente disminuida en los ratones Dectin-1^{-/-}. Por el contrario, Taylor *et al.* (Taylor et al., 2007)

defienden que los ratones deficientes en Dectin-1 son más susceptibles a la infección por *C. albicans* debido a una disminución del reclutamiento de células inflamatorias tras la infección, lo que provoca un aumento sustancial de los hongos y de su diseminación. Estos autores demuestran que la producción de citoquinas mediada por Dectin-1, lleva a un mayor reclutamiento de las células inflamatorias, siendo este necesario para el control de la infección. Estos resultados aparentemente contradictorios, podrían explicarse porque a lo largo de la infección, existen numerosas respuestas que colaboran unas con otras. Dectin-1 es sólo el primero de muchos PRRs que puede mediar su propia señalización además de sinergizar con los TLRs para iniciar respuestas específicas contra agentes infecciosos (Dennehy and Brown, 2007). Por otra parte, ambos ratones han sido generados en distintos fondos genéticos, Balb/cA *versus* 129/C57BL/6, que difieren en la polarización de las células T que inducen. En cualquier caso, todos estos datos apoyan la idea de que Dectin-1 tendría un papel determinante en el establecimiento del correcto balance final entre las respuesta pro- y anti-inflamatorias durante las infecciones fúngicas (Reid et al., 2009). Más aún, las respuestas mediadas por Dectin-1 también parecen estar implicadas en mecanismos de autoinmunidad. En los ratones SKG, utilizados como modelo de artritis reumatoide, el uso de ligandos de Dectin-1 ha demostrado inducir la enfermedad, mientras que el bloqueo del receptor con anticuerpos, previene el desarrollo de la misma (Yoshitomi et al., 2005). Parece probable que la capacidad de Dectin-1 para captar e internalizar antígenos endógenos, pueda contribuir al desarrollo de este tipo de enfermedades (Weck et al., 2008).

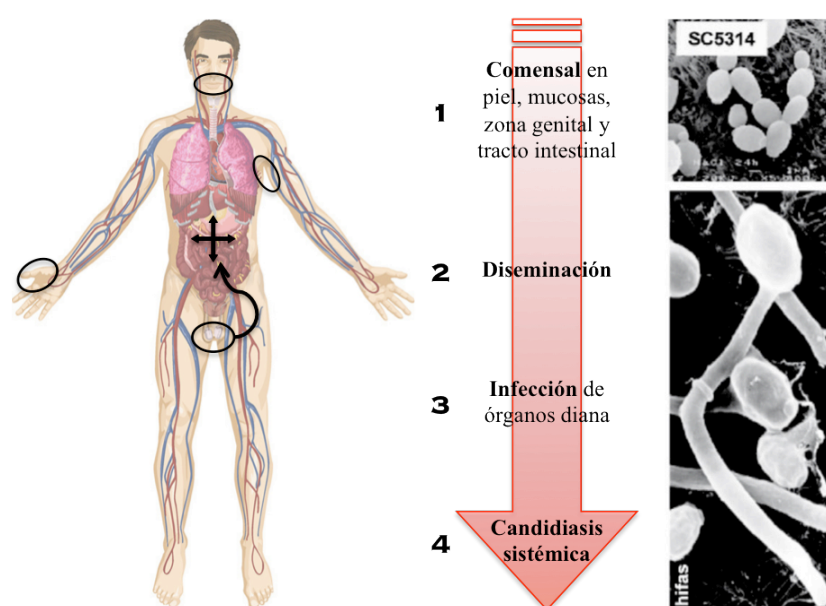
Por último, en relación con la susceptibilidad a infecciones fúngicas en humanos, Ferwerda *et al.* (Ferwerda et al., 2009) han identificado recientemente una familia alemana que *in vitro*, mostraba una respuesta a β -glucano alterada y cuya manifestación clínica se limitaba exclusivamente a las mucosas y las uñas (Ferwerda et al., 2009). Dicha familia posee una mutación que varía el aminoácido 238 de tirosina a un codón de parada temprana (Tyr238X) en el dominio CTLD de Dectin-1 (exón 6, ver Figura 6) y que aparece con una frecuencia de entre el 3% y el 7% en Europa y África. Esta forma mutada apenas se expresa en la superficie de las células mieloides, no media la unión a β -glucano e induce una producción alterada de IL-17, TNF- α e IL-6 tras la estimulación con β -glucano o *C. albicans*. Sin embargo, la fagocitosis y la eliminación del patógeno no se ven afectados en estos pacientes, lo que indicaría que hay receptores alternativos que suplirían su función. Es decir, en humanos, la pérdida de función de Dectin-1 (en individuos portadores del polimorfismo), da lugar a infecciones fúngicas

mucocutáneas, pero no parece estar relacionada con el aumento en la susceptibilidad a infecciones sistémicas, como sí ocurre en ratones deficientes en Dectin-1 (Reid et al., 2009). Estas diferencias pueden ser debidas, además de a las diferencias estructurales y funcionales del receptor en humanos y en ratón, a que en esta última especie, *C. albicans* no aparece en estado comensal, sino patogénico. Otro estudio similar que apoya al anterior, muestra que la mutación de CARD9, la molécula adaptadora de Dectin-1, da lugar a un fenotipo casi idéntico al del polimorfismo de Dectin-1, alterando tanto la señalización a través de dicho receptor, como la producción de células T_h17 (Glocker et al., 2009). Ambos estudios revalidan la importancia de Dectin-1 en la inmunidad antifúngica, aunque es necesario ahondar más en las consecuencias funcionales de este polimorfismo en humanos. En este sentido, Plantinga *et al.* han realizado estudios recientes sobre las consecuencias funcionales de la presencia del polimorfismo Y238X en el gen *DECTIN-1* en pacientes transplantados con células madre hematopoyéticas (Plantinga et al., 2009) y en pacientes con artritis reumatoide (Plantinga et al., 2010). En los primeros, la presencia del codón de parada de Dectin-1 sí aumentaba la susceptibilidad a la colonización por *Candida*. Por el contrario, aunque la expresión de Dectin-1 en tejido sinovial de pacientes enfermos de artritis reumatoide era elevada y la producción de citoquinas estaba alterada, la pérdida de uno de los alelos funcionales de Dectin-1 no se asociaba con la susceptibilidad o la severidad de la enfermedad.

4. *CANDIDA ALBICANS*

Candida albicans es un hongo comensal que habita en la flora microbiológica de la piel y de las mucosas gastrointestinales, del tracto genitourinario y del tracto respiratorio. Es la especie más abundante y significativa que podemos encontrar en los seres humanos (Eggimann et al., 2003), pero a pesar de ser considerada un comensal inocuo en individuos sanos, este patógeno oportunista puede romper su situación comensal para diseminarse por el cuerpo y acceder a órganos internos, convirtiéndose en patógeno y provocando graves infecciones (denominadas candidiasis) como resultado de una disminución de las defensas inmunes (Figura 9). En pacientes con alteraciones en la inmunidad mediada por linfocitos T, con enfermedades hematológicas o transplantados, *C. albicans* puede colonizar órganos y tejidos dando lugar a

candidiasis localizadas o diseminadas (Odds, 1987; Romani, 2004) que pueden poner en grave riesgo la supervivencia del individuo (Odds et al., 1998). El número creciente de infecciones con el VIH contribuye al aumento de otro grupo de individuos inmunodeprimidos, muy susceptibles a las infecciones fúngicas, y en los que *C. albicans* ha sido reconocido como la causa más frecuente de infecciones oportunistas. Este amplio espectro clínico ha convertido a *C. albicans* en uno de los principales modelos de patogenicidad fúngica además de un paradigma de las relaciones huésped-patógeno.



Adaptado de Román E. et al. Trends in Immunol. 2007

Figura 9. Ciclo infeccioso de *Candida albicans*. El delicado equilibrio entre comensalismo y enfermedad. *C. albicans* es un organismo comensal que forma parte de la microbiota de la piel, las mucosas y el tracto intestinal (1). En situaciones de inmunodepresión, *C. albicans* puede penetrar a través del epitelio y/o el endotelio, accediendo al torrente sanguíneo y por tanto diseminándose por el organismo (candidemia; 2) e infectando órganos diana (3), dando lugar a candidiasis sistémicas (4). A la derecha se muestra una fotografía de microscopía electrónica de barrido de la cepa silvestre SC5314 de *C. albicans* en forma levaduriforme o de blastoespora (unicelular) en la parte superior y filamentosas o de hifa en la parte inferior.

4.1.- Estructura de la pared celular de *C. albicans*.

La pared celular es una organela exclusiva de los microbios y esencial para el mantenimiento de la viabilidad fúngica (Cassone et al., 1987). Además, representa el interfaz entre el huésped y el patógeno, por lo que es considerada una diana terapéutica

de gran valor, más aún dado el alto grado de conservación de sus PAMPs. Esta estructura externa, compleja y dinámica, no sólo confiere al microbio su morfología sino que también lo protege del exterior. La pared celular cumple una función aún más importante en los organismos patogénicos, mediando la adhesión a los tejidos del huésped y siendo crucial para el inicio de la colonización y por tanto de la infección (Calderone and Fonzi, 2001; Romani, 2004). Puesto que es la estructura detectada por el huésped, la pared celular participa en la activación y en la modulación de la respuesta inmune, teniendo una función mucho más evidente en los patógenos oportunistas, que solamente causan enfermedad si existe una defensa inmune alterada en el huésped. Para permitir al patógeno adaptarse al variable ambiente del huésped, la pared celular debe ser fuerte a la vez que plástica, combinando componentes estructurales y componentes de matriz (Netea et al., 2008). La estructura de la pared celular de *C. albicans*, se compone de un núcleo de β -(1,3)-glucano, unido covalentemente a β -(1,6)-glucano (polímeros de D-glucosa que representan un 50-60% del peso seco de la pared) y quitina (polímero de N-acetil-glucosamina unido por enlaces β -1,4 que representa un 1-2%) que sirve como esqueleto para la capa externa o matriz, compuesta principalmente por manoproteínas que están N- u O-glicosiladas (en función del residuo que se glicosila), denominadas en general mananos (35-40%) y unidas al núcleo interno a través de los β -(1,6)-glucanos (Poulain and Jouault, 2004) (Figura 10). El β -(1,3)-glucano y la quitina son responsables de la solidez de la pared y son detectados mediante microscopía electrónica de transmisión como una capa interna menos densa a los electrones, comparada con la externa de manoproteínas (Figura 10).

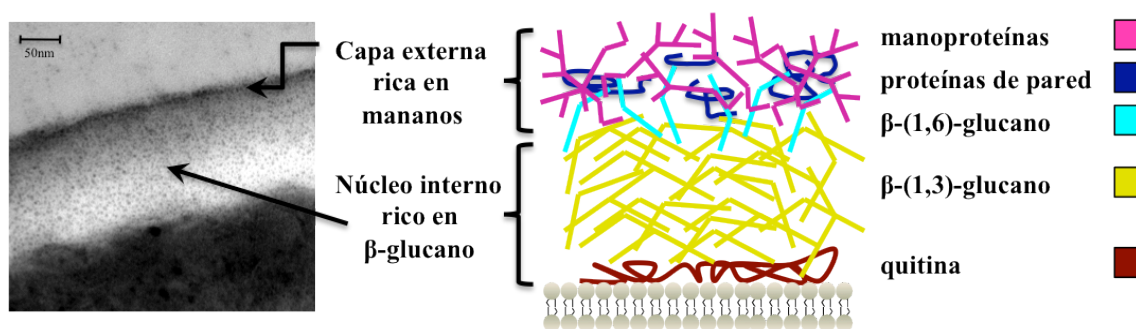


Figura 10. Estructura de la pared celular de *C. albicans*. El esquema muestra los principales componentes de la pared celular y su distribución en la misma. La capa externa está enriquecida en proteínas de pared y manoproteínas ancladas a través de β -(1,6)-glucano al esqueleto o núcleo interno compuesto principalmente por β -(1,3)-glucano y quitina (poli- β -(1,4)-N-acetilglucosamina). La fotografía de microscopía electrónica muestra esta estructura laminar en una cepa silvestre de *C. albicans* (CAF2).

Con el fin de mantener la integridad celular, la síntesis de los polímeros de la capa interna está acoplada al crecimiento del hongo, existiendo mecanismos compensatorios que la regulan en respuesta a perturbaciones externas o internas (Douglas, 2001). La capa externa muestra un elevado grado de glicosilación de sus proteínas y es responsable de la porosidad de la pared. Se ha descrito que el fallo en los mecanismos de glicosilación de *C. albicans* provoca defectos en la integridad de la pared celular y en la activación de vías de señalización de MAP quinasas, pudiendo afectar incluso a la virulencia del patógeno (Bates et al., 2006). Además de las proteínas fundamentales que determinan la estructura multilaminar de la pared celular de *C. albicans*, existen muchas otras proteínas que la componen y que son responsables de gran parte del comportamiento del patógeno en relación con el huésped (Sohn et al., 2006). Un ejemplo de este tipo de proteínas lo componen la familia de proteínas ALS, un extenso grupo de glicoproteínas de superficie implicadas en la adhesión tisular, tanto en *C. albicans* como en otros patógenos (Filler, 2006; Hoyer, 2001), cuya expresión depende del ambiente e influye profundamente en la adhesión y patogenicidad del hongo.

4.2- Morfología de *C. albicans*: relación entre el dimorfismo y la virulencia.

La morfología del hongo es un factor determinante para su detección por el sistema inmune. *C. albicans* es un hongo polimórfico que puede crecer tanto en forma unicelular o levaduriforme (conidios o blastoesporas) como en forma micelial (filamentos o hifas y pseudohifas) mediante un proceso conocido como transición dimórfica (Brown and Gow, 1999) (Figura 11). Este polimorfismo depende del ambiente (temperatura, presencia de suero, pH, etc.) y juega un papel fundamental en la colonización, adhesión y virulencia del patógeno (Braun and Johnson, 1997; Calderone and Fonzi, 2001; Kobayashi and Cutler, 1998; Lo et al., 1997; Saville et al., 2003; Whiteway and Oberholzer, 2004). Aunque el dimorfismo ha sido considerado durante mucho tiempo como un factor de virulencia determinante de *C. albicans* (Lo et al., 1997), en la actualidad, ni la forma de spora ni la forma de hifa son estrictamente consideradas factores determinantes de virulencia (Alonso-Monge et al., 1999; Braun and Johnson, 1997; Kobayashi and Cutler, 1998). La habilidad de cambiar entre ambos estados es lo que debería considerarse realmente un determinante de virulencia. Así, las

formas levaduriformes parecen adaptarse mejor a crecimientos rápidos, facilitando su diseminación por el torrente sanguíneo durante el inicio de la infección. Las hifas por el contrario, son más resistentes a la fagocitosis (debido a su morfología y tamaño) (Saville et al., 2003), pueden provocar la muerte del fagocito si germinan en su interior, y son capaces de penetrar a través de las capas epiteliales y endoteliales, facilitando la invasión. Consecuentemente, la forma filamentosa del hongo se ha visto implicada en provocar un mayor daño tisular en modelos *ex vivo* de candidiasis (Kumamoto and Vines, 2005; Saville et al., 2003). Además, los mutantes incapaces de formar filamentos son menos virulentos en algunos modelos experimentales (Leberer et al., 1997; Lo et al., 1997), aunque los mutantes hiperfilamentosos también muestran una virulencia reducida (Alonso-Monge et al., 1999; Braun and Johnson, 1997).

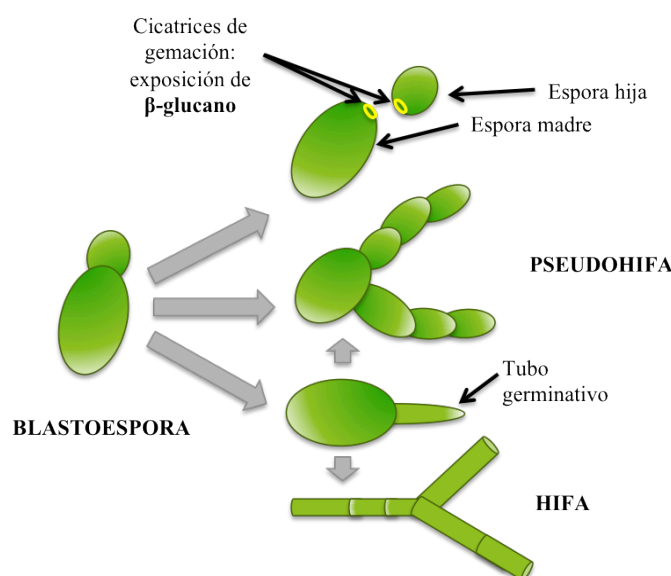


Figura 11. Representación de las morfologías de *C. albicans*. Las esporas o blastoesporas geman dando lugar a yemas que al separarse dejan cicatrices de gemación en ambas blastoesporas madre e hija (representadas por los anillos amarillos en la imagen), que dejan el β -glucano al descubierto. Las pseudohifas se forman por gemación de las blastoesporas y son unidades celulares elongadas que permanecen unidas sin que existan verdaderos septos sino constricciones de la pared celular que por tanto no exponen el β -glucano. Las hifas son filamentos ramificados del hongo, formadas por unidades celulares separadas por septos de quitina y formadas por la extensión apical de la espora o de la pseudohifa, que da lugar a un tubo germinativo que se va elongando con el tiempo.

Debido a la distinta estructura y composición de pared celular, así como a los distintos programas transcripcionales, cada uno de los morfotipos interacciona de distinta forma con las células del sistema inmune (d'Ostiani et al., 2000; Romani, 2004;

Torosantucci et al., 2004; van der Graaf et al., 2005), permitiendo incluso su evasión en determinadas circunstancias (Lo et al., 1997; Saville et al., 2003). Así, en DCs la forma de espora es reconocida por MR, DC-SIGN y Dectin-1, mientras que las morfologías filamentosas son reconocidas por los receptores Fc, el CR3 y Dectin-2 (Romani et al., 2004). Más aún, las DCs son capaces de inducir distintos tipos de respuesta en función de las diferentes morfologías de *C. albicans* reconocidas. En respuesta a las blastoesporas, las DCs inducen la secreción de IL-12, activando una respuesta de tipo T_h1 o protectora, mientras que en respuesta a las hifas, inducen la secreción de IL-4 y por tanto de una respuesta de tipo T_h2 . Es decir, las DCs pueden reconocer y diferenciar ambas morfologías y en función de las mismas, determinar el tipo de respuesta, favoreciendo un estado comensal, o por el contrario erradicando al patógeno y con él la infección (d'Ostiani et al., 2000).

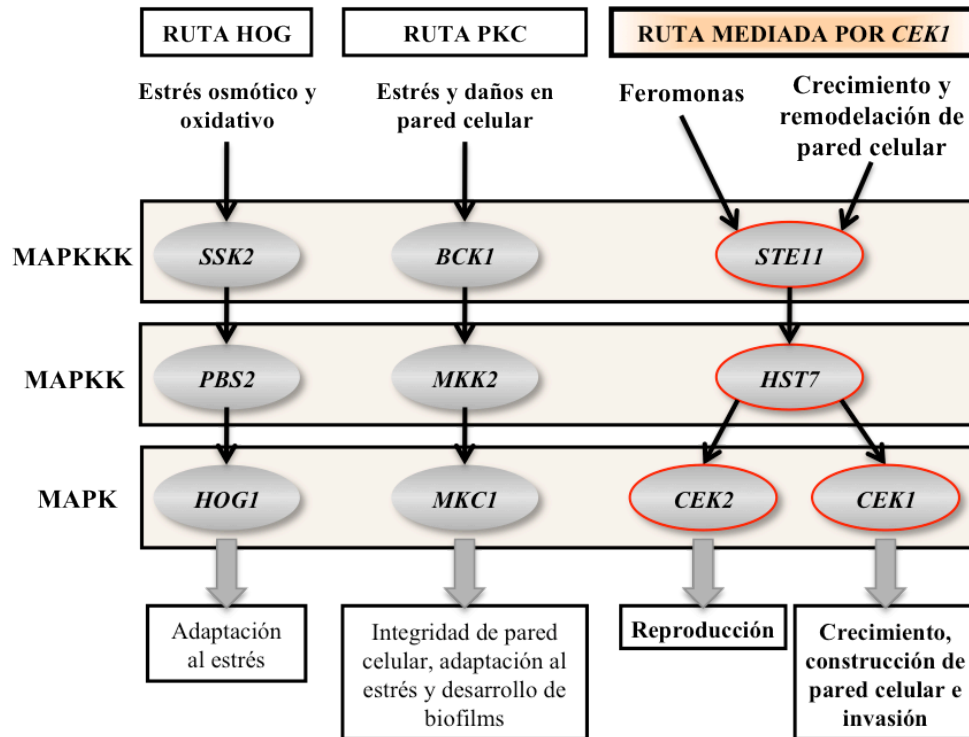
4.3- Rutas de MAP quinasas de *C. albicans* y su implicación en virulencia.

La supervivencia del patógeno depende en gran medida de su adaptación al ambiente hostil y variable del huésped así como a las defensas del mismo. Los hongos han desarrollado distintas estrategias de supervivencia para colonizar e infectar al huésped, pero todas ellas implican necesariamente la capacidad de sentir y responder a las señales ambientales como cambios en el pH, en el estrés osmótico y oxidativo o la limitación de nutrientes (Roman et al., 2007). En este proceso adaptativo, son de vital importancia las rutas de transducción de señales mediadas por las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) del hongo (Monge et al., 2006; Roman et al., 2007; Whiteway, 2000). Estas proteínas, exclusivas de eucariotas, se diferencian de otras quinasas en que son fosforiladas simultáneamente en dos residuos conservados (Thr y Tyr). En los hongos patógenos, las MAPKs son esenciales para controlar la adaptación al estrés ambiental. Diversos estudios han puesto de relieve el papel principal de las MAPKs en el control de factores de virulencia esenciales como la biogénesis de la cápsula en *C. neoformans*, o la morfogénesis, la invasión y el estrés oxidativo en *C. albicans* (Roman et al., 2007). A pesar de que existen grandes diferencias entre las rutas de las MAPKs de mamíferos respecto de las fúngicas, la estructura de dichas cascadas de MAPKs está muy conservada (hecho que limita enormemente las terapias antifúngicas). Básicamente, la ruta comprende tres quinasas que se fosforilan de forma secuencial. Los

receptores situados en la membrana plasmática tras recibir el estímulo correspondiente, fosforilan alguna de las diversas proteínas adaptadoras (generalmente de tipo GTPasa o proteínas G) que a su vez fosforilan a la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK). La MEKK a su vez dispara la fosforilación de la MAP quinasa quinasa (MAPKK o MEK) que finalmente fosforila la MAP quinasa (MAPK). Tras su fosforilación, la MAPK se transloca al núcleo, activando sus correspondientes dianas entre las que se encuentran factores de transcripción y otras moléculas que determinan el patrón de transcripción génica adecuado y específico, posibilitando la respuesta al estímulo y la adaptación a las nuevas condiciones externas. A pesar de que las MAPKs son activadas por diversas señales, existe una gran interrelación e incluso un solapamiento entre ellas, que les permite integrar, amplificar y modular la correspondiente respuesta adaptativa y protectora.

En *C. albicans* se han descrito cuatro rutas diferentes de MAP quinasa (Figura 12). La ruta HOG está mediada por la MAPK Hog1 y se ha visto implicada *in vitro* en la adaptación al estrés osmótico y oxidativo (Alonso-Monge et al., 1999; Alonso-Monge et al., 2003; Arana et al., 2005), aunque también hay algunas evidencias que la implican en morfogénesis (Alonso-Monge et al., 1999; Alonso-Monge et al., 2003; Arana et al., 2005). La ruta PKC o ruta de integridad celular, mediada por la MAPK Mkc1, participa en la construcción de la pared celular (Navarro-Garcia et al., 1998; Navarro-Garcia et al., 1995), en la respuesta a estrés (Navarro-Garcia et al., 2005), en la transición morfológica (Navarro-Garcia et al., 1998) así como en la formación de *biofilms*. Por último, la ruta mediada por la MAPK Cek1 (Whiteway et al., 1992) está implicada en morfogénesis, en la formación hifal y en el proceso de apareamiento. Esta ruta se caracteriza porque comprende la MEK Hst7 (Leberer et al., 1996) así como dos quinasa parcialmente redundantes, la MAPK Cek1 y la Cek2 (considerada la cuarta ruta MAPK). La delección del gen *CEK1* (*Candida albicans ERK-like-1*) presenta un fenotipo que se traduce en un defecto parcial de la eficiencia del apareamiento de la levadura, debido a la existencia de la MAPK redundante Cek2. El doble mutante *cek1 cek2* es completamente incapaz de aparearse en comparación a como lo hacen los mutantes *hst7* (Chen et al., 2002). También se ha comprobado que la ausencia de Cek1 confiere a la célula defectos en el crecimiento invasivo en ciertos medios (Leberer et al., 1996) y una virulencia reducida en determinados modelos de candidiasis (Csank et al., 1998; Guhad et al., 1998). Por último, esta ruta también se ha visto implicada en la biogénesis de la pared celular, ya que se ha comprobado que los mutantes *cek1*

muestran hipersensibilidad a diversos agentes que interfieren con el correcto ensamblaje de la misma, como el rojo de Congo o el blanco de calcoflúor (Eisman et al., 2006; Roman et al., 2005).



Adaptado de Alonso-Monge *et al.* Microbiology 2006

Figura 12. Esquema general de las rutas de MAPKs de *C. albicans*. En la parte superior y encuadrados, se muestran los nombres de las cuatro rutas de MAPKs descritas en *C. albicans*. Una vez que el estímulo correspondiente es detectado por el receptor de membrana, este transfiere la señal a una molécula adaptadora que a su vez la envía al núcleo central de la ruta, compuesto por la MAPKKK (MEKK), la MAPKK (MEK) y la MAPK. La MAPK fosforilada se trasloca al núcleo donde fosforila a su vez factores de transcripción u otras moléculas reguladoras, provocando la activación transitoria de los genes diana que regulan las funciones esquematizadas en la parte inferior.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis consistió en **analizar el papel desempeñado por el receptor de reconocimiento de patrones humano Dectin-1 en la respuesta inmune innata frente al patógeno fúngico *Candida albicans*, analizando la implicación que tienen en dicha interacción las rutas de transducción de señales mediadas por proteínas quinasas de tipo MAP del hongo.**

A continuación se exponen los objetivos concretos planteados:

- 1. Determinar si existe un reconocimiento diferencial de los mutantes en las rutas MAPKs de *C. albicans* por parte del sistema inmune.**
 - Determinación de los niveles de unión de las cepas mutantes en las cuatro rutas MAPKs identificadas en *C. albicans* a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) implicados en su detección.
 - Análisis de la especificidad de unión a Dectin-1 de los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.
- 2. Caracterizar estructural y funcionalmente los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.**
 - Determinación de la ultra-estructura de la pared celular de los mutantes.
 - Análisis de los niveles de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) expuestos en la pared celular de los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.
- 3. Analizar las consecuencias funcionales que tiene la delección de la MAPK *Cek1* de *C. albicans* sobre la respuesta inmune.**
 - Análisis de las respuestas específicas mediadas por Dectin-1 en respuesta al mutante *cek1* de *C. albicans* en células primarias humanas (hDCs y hMΦs).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de *Candida albicans* usadas, condiciones de crecimiento, marcaje e inactivación de las mismas. Excepto si se indicase lo contrario, *cek1*, *hst7* y *cek2*, se refieren a las cepas homocigotas Ura⁺ CK43B-16 (Csank et al., 1998), CDH9 (Leberer et al., 1996) y BEC73 (Eisman et al., 2006; Navarro-Garcia et al., 2005) respectivamente, mientras las cepas CAF2 (Fonzi and Irwin, 1993) y RM100 (Alonso-Monge et al., 2003) fueron usadas como cepas silvestres (*wild-type*, wt). Los hongos se crecieron en medio enriquecido YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar, si es necesario) a 30° C y se usaron células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento. La tinción con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se realizó siguiendo métodos previamente descritos (Serrano-Gomez et al., 2007). Para la inactivación con luz ultravioleta (UV) de las blastoesporas, 2×10^8 células en PBS fueron expuestas a una única dosis de radiación UV ($1.2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) en un UV-DNA *crosslinker*. Las levaduras muertas por calor se obtuvieron hirviendo en PBS (20 min., 98° C) 2.5×10^7 células. En ambos casos, tras el tratamiento, las células eran lavadas nuevamente con PBS y se cuantificaba su concentración en un hematocitómetro Neubauer.

Crecimiento de líneas celulares. Las líneas celulares HEK293T (células embrionarias humanas de riñón) y RAW 264.7 (células macrofágicas de ratón) fueron obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*) y cultivadas *in vitro* en medio DMEM completo (suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*, FCS), 1% penicilina-estreptomicina y 4mM glutamina). La línea linfoblástica humana K562 (ATCC) se cultivó en medio RPMI completo y los transfectantes estables para Dectin-1 (obtenidos en el laboratorio) o DC-SIGN (cedidos por el Dr. Angel L. Corbí del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid) fueron mantenidos con neomicina a 0.7 mg/ml.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se usaron células en fase estacionaria y tras recogerlas por centrifugación y lavarlas con PBS, los *pellets* fueron prefijados en glutaraldehído (3% glutaraldehído en 0,1M tampón fosfato, pH 7.4)

durante 1 hora. A continuación se añadió una solución de agar (1,5%), seguida de una nueva fijación con glutaraldehído durante 30 min. Tras sucesivos lavados intensivos con el tampón fosfato, las muestras fueron fijadas de nuevo con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora y posteriormente embebidas en resina (Durcupan). Las secciones ultrafinas obtenidas se tiñeron con acetato de uranilo al 2%. El análisis de las muestras se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión *Zeiss EM 900* equipado con una cámara *Show Scan CCD-camera* (TRS).

Generación de transfectantes estables de Dectin-1 en células K562. El cDNA de Dectin-1-Flag se obtuvo mediante amplificación por transcripción reversa (RT)-PCR a partir de ARN total de células mononucleadas de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) utilizando oligos específicos para toda la región codificante de Dectin-1 humano fusionada al epítipo Flag (aparece subrayado en la secuencia del oligo) en el extremo carboxi-terminal. Oligo directo: 5'-CAG GGG CTC TCA AGA ACA ATG G-3' y reverso: 5'-TTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT TGA AAA CTT CTT CTC ACA AAT ACT ATA TGA GGG -3'. El cDNA resultante fue clonado en el *pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit* (Invitrogen) y transfectado en la línea celular K562 mediante nucleofección (*Cell Line Nucleofector KitV* de Amaxa Biosystems). Las células fueron seleccionadas por su resistencia a neomicina (0.8 mg/ml) y aisladas usando un *FACS Aria cell sorter* (BD-Biosciences) tras su tinción con anti-FLAG mAb (Sigma-Aldrich).

Obtención de macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos humanos (hMΦ y hDC). Las PBMCs fueron purificadas a partir de concentrados leucocitarios (*buffy-coats*) de pacientes sanos siguiendo protocolos previamente descritos (d'Ostiani et al., 2000; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Brevemente, los monocitos se purificaron mediante selección positiva con microesferas magnéticas acopladas a CD14 (Miltenyi Biotech) y fueron cultivados a una densidad celular $0.7-1 \times 10^6$ células/ml entre 5 y 7 días en medio RPMI completo suplementado con 1000 U/ml de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y 1000 U/ml de IL-4 (ImmunoTools) en el caso de las hDCs o 1000 U/ml de GM-CSF para los hMΦs. El medio era sustituido y se añadían citoquinas cada dos días.

Producción de las proteínas solubles de Dectin-1: sDectinFc y sDectinFlag.

El cDNA codificante de toda la región extracelular del Dectin-1 humano (aminoácidos 71-247, incluye el cuello y el CRD) fue clonado en el plásmido pBSKS-D, introduciendo el epítipo HA (YPYDVPDYA) en C-terminal. Posteriormente, el cDNA con el HA, fue a su vez clonado en fase bien con la región Fc de la inmunoglobulina G1 humana, IgG1-Fc (Fc), o bien con el epítipo Flag (DYKDDDDK), en el vector de expresión para sistemas eucariotas pEF-Boss (Jimenez et al., 2005). Dicho plásmido permitió además introducir un péptido señal Igk (cadena ligera κ de la inmunoglobulina) en el extremo N-terminal. Las proteínas fueron expresadas de forma transitoria en células HEK293T transfectadas mediante el método del fosfato cálcico. Después de al menos tres días, se recolectaron los sobrenadantes en los que se encontraban las proteínas solubles fusionadas a Fc o a Flag secretadas y se determinó su concentración mediante ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo *sandwich* con anticuerpos (Abs) contra la región Fc (Dako) o con anticuerpos anti-HA (en el caso de la proteínas sDectinFlag). La solución que contenía la proteína soluble (sDectinFc o sDectinFlag) fue filtrada y se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A (sDectinFc) o con anti-HA (sDectinFlag). Se realizó una purificación final por cromatografía de filtración en gel (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) para la eliminación de agregados y proteína no plegada correctamente. Para reducir la salinidad de las proteínas solubles, ambas fueron dializadas frente a una dilución de PBS en H₂O, tras lo cual fueron liofilizadas para su concentración y mantenimiento.

Desarrollo y obtención del anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano

MGD3. El anticuerpo monoclonal (mAb) anti-Dectin-1 humano MGD3 fue generado inmunizando ratones de la cepa BALB/c (para maximizar las probabilidades de obtener un mAb con la especificidad deseada se inmunizaron 5 ratones) con la proteína de fusión sDectinFlag, que contenía toda la región extracelular del receptor fusionada al epítipo Flag. Cada ratón fue inmunizado con 20 μ g de la proteína soluble disuelta en 150 μ l de PBS mezclados con el mismo volumen de adyuvante completo de Freund (*Freund's complete Adjuvant*, FCA). Se realizaron un total de cinco inmunizaciones, las dos últimas, 3 y 2 días antes de la fusión respectivamente (entre 90-120 días después de la primera inmunización). Las células del bazo de los ratones inmunizados fueron fusionadas al plasmacitoma de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC) siguiendo protocolos estandarizados (Kohler and Milstein, 1975). La selección inicial del mAb se hizo

testando la capacidad de los sobrenadantes de reconocer la proteína de fusión usada en la inmunización mediante técnicas de ELISA. A continuación, los clones positivos fueron seleccionados mediante citometría de flujo, en función de su habilidad para reconocer específicamente Dectin-1 en los transfectantes estables de dicho receptor en la línea celular K562, así como en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (hDC). El hibridoma seleccionado fue estabilizado mediante clonación por dilución límite y se llevó a cabo la producción a gran escala del anticuerpo. El mAb MGD3 se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína-A-sefarosa (GE Healthcare). Posteriormente se realizaron diversos ensayos con técnicas de resonancia de plasmones superficiales (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) usando el biosensor *BIAcore*TM 3000 (GE Healthcare) que permite visualizar en tiempo real el proceso de interacción entre biomoléculas y por tanto caracterizar la afinidad del mAb por sus ligandos. El Anexo 1 muestra la caracterización del anticuerpo MGD3, así como la patente a la que ha dado lugar.

Ensayos de unión (*binding*) a *Candida albicans*. Los ensayos de unión se realizaron siguiendo métodos previamente descritos (Brown and Gordon, 2001). Se usaron células en fase estacionaria conjugadas con FITC, bloqueadas con PBS suplementado con 2% BSA, 1% FCS y 50 µg/ml de inmunoglobulina humana (*Staining PBS*) y resuspendidas en medio completo. En los casos requeridos, las células eran pretratadas (20 min., a temperatura ambiente, RT) con laminarina (500 µg/ml; Sigma-Aldrich) o mAb anti-Dectin-1 MGD3 (5µg/ml). La multiplicidad de infección (*Multiplicity of Infection*, MOI) de las levaduras marcadas con FITC fue de 10 blastoesporas por cada célula durante 30 min. a RT. Tras exhaustivos lavados con PBS para eliminar las levaduras no unidas, se fijaban las muestras con paraformaldehído al 3.7% durante 1 hora a RT y tras un nuevo lavado eran analizadas por citometría de flujo.

Ensayos de fagocitosis. Se incubaban los hMΦ o hDC con medio sólo o suplementado con los bloqueos correspondientes (5µg/ml; 30 min., 37° C). Tras lavar, se añadía medio nuevo con las blastoesporas marcadas con FITC (5 esporas: 1 célula) y se incubaba entre 15-30 min. a 37° C. Las células eran pasadas inmediatamente a hielo y se lavaban enérgicamente con PBS frío. La tinción de las levaduras se hizo siguiendo el método previamente descrito (Moreno-Ruiz et al., 2009). Brevemente, las esporas no

internalizadas se marcaban con anticuerpo policlonal (pAb) anti-*C. albicans* (cedido por el Dr. C. d'Enfert del Institut Pasteur, Paris) seguido de un Ab secundario acoplado al fluorocromo Alexa-647; de esta forma se distinguían de las esporas que sí estaban internalizadas y que estaban previamente conjugadas a FITC. Posteriormente las células eran fijadas y permeabilizadas antes de ser marcadas con Faloidina conjugada al fluorocromo Alexa-568 (detecta los filamentos de actina). Tras el montaje de las muestras, el análisis era llevado a cabo utilizando un microscopio confocal Leica TCS-SP (Leica Microsystems). Para cada donante analizado se tomaron al menos diez imágenes de distintos campos de la preparación, para cada una de las condiciones analizadas (sin tratar, o pre-tratadas con IgG2a o MGD3), para cada cepa de levadura (CAF2 y *cek1*) y para cada tipo de fagocito (hMΦ or hDC). Se cuantifico en cada uno de estos campos el número de levaduras internalizadas y el número de fagocitos, calculando finalmente el índice fagocítico como el número de levaduras internalizadas por cada cien fagocitos.

Ensayos de eliminación o aniquilamiento (*killing*) con hDCs y hMΦs. Estos ensayos se realizaron siguiendo métodos previamente descritos (Arana et al., 2007). Brevemente, las células de *C. albicans* eran co-incubadas con las hDCs o los hMΦs (1 espora: 20 fagocitos) durante 4 h a 37° C. Tras lisar los fagocitos con agua, se hacían diluciones seriadas que eran sembradas sobre placas de agar YPD para, tras 24 h. a 37° C, determinar las unidades formadoras de colonias (*Colony Forming Units*, CFU). El porcentaje de aniquilamiento de cada cepa era expresado como la reducción del porcentaje de CFUs existentes entre los co-cultivos de los fagocitos con las blastoesporas *versus* cultivos simultáneos sólo con levaduras.

Ensayos de Western Blot. El día anterior las células se ponían en medio con suero reducido para ajustar los niveles basales de fosforilación y tras someterlas a los tratamientos correspondientes, se trataban con tampón de lisado (40 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1X *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* y 1X *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Roche). Los lisados celulares totales (40 µg) eran resueltos mediante electroforesis (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en condiciones reductoras. La activación de ERK1/2, Syk y Raf-1 fue detectada usando Abs específicos para anti-fosfo-p44/42-MAPK/ anti-p44/42-MAPK (Cell Signaling), anti-fosfo-Syk (Calbiochem) / anti-Syk mAb (Upstate) y anti-

fosfo-Raf-1 (Tyr340/341) / anti-Raf-1 Abs (Upstate, Millipore). Los niveles de I κ B- α se detectaron con anti-I κ B- α pAb (Santa Cruz, C-15).

Ensayos de luciferasa. La línea celular HEK293T fue co-transfectada con el plásmido reportero AP-1-Luc (250 ng / 10⁵ células) y el plásmido pRL-Null (5 ng / 10⁵ células; Promega) portador del gen de la luciferasa de *Renilla* sin promotor y usado para la normalización de los datos. Estos plásmidos reporteros se transfectaron junto con el vector de expresión del receptor (pCDNA3.1 Dectin-1) o el vector vacío (pCDNA3.1) (Invitrogen) usando el reactivo de transfección *Fugene HD* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 48h las células se co-cultivaban (9-12 h) con PBS, zymosan (200 μ g/ml) o las blastoesporas inactivadas por luz UV (50 esporas: 1 célula). La actividad luciferasa se determinó con el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) en un luminómetro (Berthold Detection Systems) y se expresó en unidades de luz relativas (RLU, *Relative Light Units*), como la proporción de las actividades luciferasas de *firefly*/renilla, normalizada *versus* el control (células sin tratar). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS). 10⁶ hM Φ s o hDCs fueron cultivados en medio RPMI completo sin rojo fenol (Gibco) con los distintos estímulos durante 4 h. a 37° C. Las células eran incubadas con la sonda 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (5 μ M H₂DCFDA; Molecular Probes) durante 30 min. a 37° C. Tras lavar con PBS frío la producción de ROS era analizada por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media de intensidad de fluorescencia (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*) emitida por la sonda en presencia de las distintas cepas de *C. albicans* o tratamientos, relativa a la MFI en presencia de PBS.

Estimulación de la secreción de citoquinas en hDCs. Se co-cultivaron 0.8 x 10⁶ hDCs con zymosan (200 μ g/ml, Sigma-Aldrich) o con las blastoesporas de las distintas cepas de *C. albicans* matadas por calor o inactivadas con luz UV (50 esporas: 1 célula). Para los bloqueos, las hDCs se pre-incubaban 30 min. a 37° C con mAb anti-Dectin-1 humano MGD3 (5 μ g/ml) o con un control de isotipo para IgG2a (*functional-grade purified IgG2a isotype control*; eBiosciences) antes de añadir las esporas inactivadas por luz UV (10 esporas: 1 célula). Los controles incluían hDCs sin tratar.

Los sobrenadantes se analizaron con kits comerciales de ELISA para IL-10 y TNF α (R&D e Immunotools respectivamente).

Inmunofluorescencia y citometría de flujo. Para los análisis de inmunofluorescencia, las blastoesporas vivas se dejaban 30 min. a 37° C para que se adheriesen a los cubreobjetos cubiertos de poli-L-lisina. Tras varios lavados, las levaduras adheridas, eran fijadas con paraformaldehído al 3,7% (10 min., RT). Para la tinción de las paredes, las blastoesporas de *C. albicans* vivas, matadas por calor o fijadas (en el caso de las inmunofluorescencias) eran incubadas con mAb anti- β -glucano (Biosupplies) o con la proteína soluble diseñada (sDectinFc) seguida de un anti-Fc mAb (Jackson ImmunoResearch). A continuación se usaron Abs secundarios conjugados a FITC para citometría o al fluorocromo Alexa-488 para las inmunofluorescencias (Dako y Molecular Probes respectivamente). La expresión de Dectin-1 fue determinada usando el mAb MGD3 generado, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Todas las incubaciones se realizaban a 4° C y con *Staining PBS* para bloquear. El análisis mediante citometría de flujo se realizaba en un citómetro FACSCalibur con el programa informático CellquestPro (BD-Biosciences). En el caso de las inmunofluorescencias, las preparaciones se analizaron usando un microscopio confocal (descrito anteriormente) o un fotomicroscopio convencional Leica DMR con el programa informático QFISH (Leica Microsystems).

Análisis estadístico. Las diferencias entre los grupos de datos comparados se analizaron con el test de la U de Mann-Whitney usando el programa informático SPSS. El nivel de significación entre grupos fue fijado como: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0005$. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos mostrados en esta Tesis han sido realizados al menos cinco veces y los datos presentados muestran los valores medios \pm la desviación estándar (*Standard Deviation*, SD).

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados están organizados en función de los objetivos planteados.

OBJETIVO 1: Determinar si existe un reconocimiento diferencial de los mutantes en las rutas MAPKs de *C. albicans* por parte del sistema inmune.

1.1.- Determinación de los niveles de unión de las cepas mutantes en las cuatro rutas MAPKs identificadas en *C. albicans* a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) implicados en su detección.

Los mutantes en la ruta de MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans* presentan una unión preferencial a Dectin-1.

En el patógeno fúngico *C. albicans*, las rutas de MAPKs son mecanismos implicados en la adaptación al medio que regulan la respuesta del patógeno a cambios extracelulares o intracelulares, coordinando la expresión de otros factores de virulencia con el fin de colonizar al huésped. Este proceso requiere la detección del estímulo (el estrés oxidativo y osmótico, el pH, la temperatura o la limitación de nutrientes) y la transmisión de la señal del exterior al interior celular, para poder desarrollar una respuesta específica apropiada y adaptarse a las nuevas condiciones (Figura 12). Con el fin de determinar el papel que tienen estas rutas en el reconocimiento por parte del sistema inmune, se realizó un estudio inicial de la interacción de los receptores implicados en el reconocimiento de levaduras, Dectin-1 y DC-SIGN, con mutantes en las cuatro rutas MAPKs más relevantes de *C. albicans*, Hog1, Mkc1, Cek1 y Cek2. Para ello se llevaron a cabo ensayos de unión de los mutantes (*cek1*, *cek2* y *hst7* de la ruta MAPK mediada por *CEK1*; y *hog1* y *mkc1* de las rutas HOG y PKC, respectivamente) así como de la cepa silvestre CAF2, a la línea celular eritroleucémica K562. Se usaron

tanto células silvestres (K562 wt), como transfectantes estables para ambos PRRs (K562-Dectin1 o K562 DC-SIGN) (Figura 13).

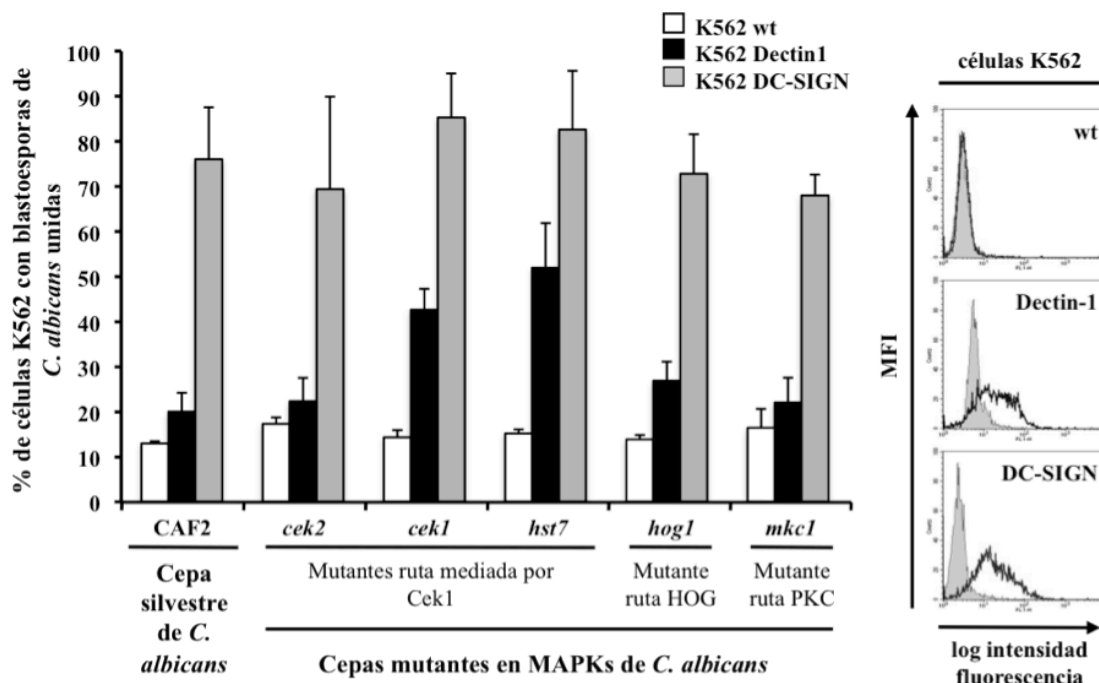


Figura 13. Determinación de los niveles de unión de los mutantes en MAP quinases de *C. albicans* a células K562 silvestres y a transfectantes estables para DC-SIGN y Dectin-1. Análisis por citometría de flujo de los niveles de unión de los mutantes en las principales MAPKs de *C. albicans* (marcadas con FITC) a las células K562 silvestres (K562 wt) o que expresan establemente Dectin-1 o DC-SIGN (K562 Dectin1 y K562 DC-SIGN, respectivamente). Las barras representan el porcentaje de células con blastoesporas unidas (media de intensidad de fluorescencia, MFI \pm desviación estándar, SD, de tres experimentos independientes). A la derecha se muestran los perfiles de citometría de flujo de los niveles de expresión de Dectin-1 y DC-SIGN en las células K562 (los histogramas grises representan el mAb control; los histogramas negros superpuestos, corresponden a los mAbs anti-Dectin-1 MGD3 y anti-DC-SIGN MR1, indicados en cada caso).

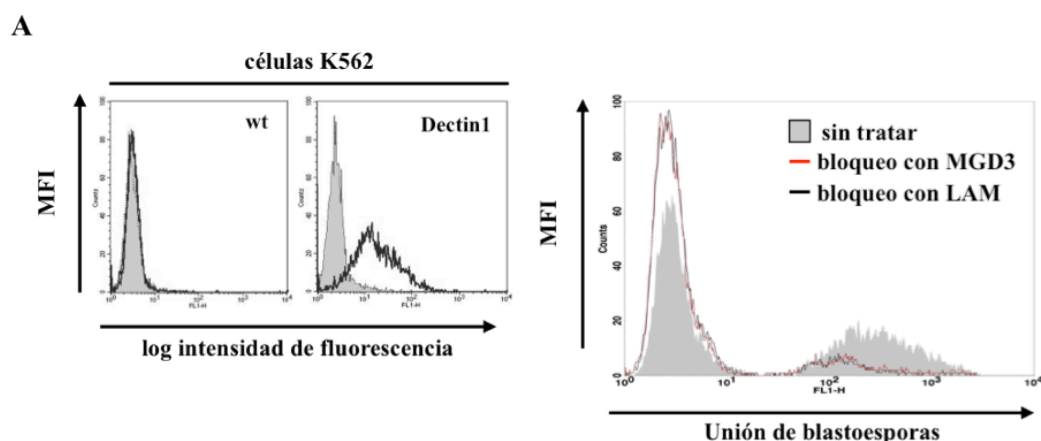
A pesar de que el transfectante estable para DC-SIGN presentaba mayores niveles de unión a las levaduras comparado con las demás células (K562 wt o K562-Dectin1), no existían diferencias representativas entre la unión de las distintas cepas analizadas. Por el contrario, las células K562-Dectin1 sí mostraban una unión preferencial a los mutantes *cek1* y *hst7* respecto del resto de mutantes analizados. Sin embargo, y a pesar de que tanto las MAPKs *Cek1* y *Cek2* son dianas potenciales de su inmediatamente anterior MAPKK *Hst7* (Figura 12), y dado que la redundancia parcial de ambas MAPKs en el control de la reproducción haría esperable un comportamiento

similar, la unión de las células K562-Dectin1 al mutante *cek2* no variaba apenas respecto de la mostrada por la cepa silvestre CAF2. En definitiva, estos datos permitían inferir que el reconocimiento diferencial de los mutantes *cek1* y *hst7* era específico, en primer lugar, de la ruta MAPK alterada (ruta mediada por *CEK1*), en segundo lugar, de la proteína MAP quinasa eliminada (Hst7 y Cek1 pero no Cek2), y en tercer lugar, del receptor de reconocimiento de patrones implicado (Dectin-1 pero no DC-SIGN). Es decir, la ausencia de *CEK1* en *C. albicans* provoca un reconocimiento más eficiente de la levadura por parte del receptor humano Dectin-1.

1.2.- Análisis de la especificidad de unión a Dectin-1 de los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.

La unión de *C. albicans* mediada por Dectin-1 se ve incrementada específicamente en los mutantes de delección *cek1* y *hst7* en comparación con la de la cepa silvestre CAF2.

Una vez delimitada la implicación de la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans* en la unión preferencial a transfectantes estables de Dectin-1 (Figura 13); se trató de dilucidar si además dicha unión era específica para dicho receptor. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de unión de los mutantes de delección *cek1* y *hst7*, al transfectante estable K562-Dectin1 en presencia o no de agentes bloqueantes del receptor (Figura 14A).



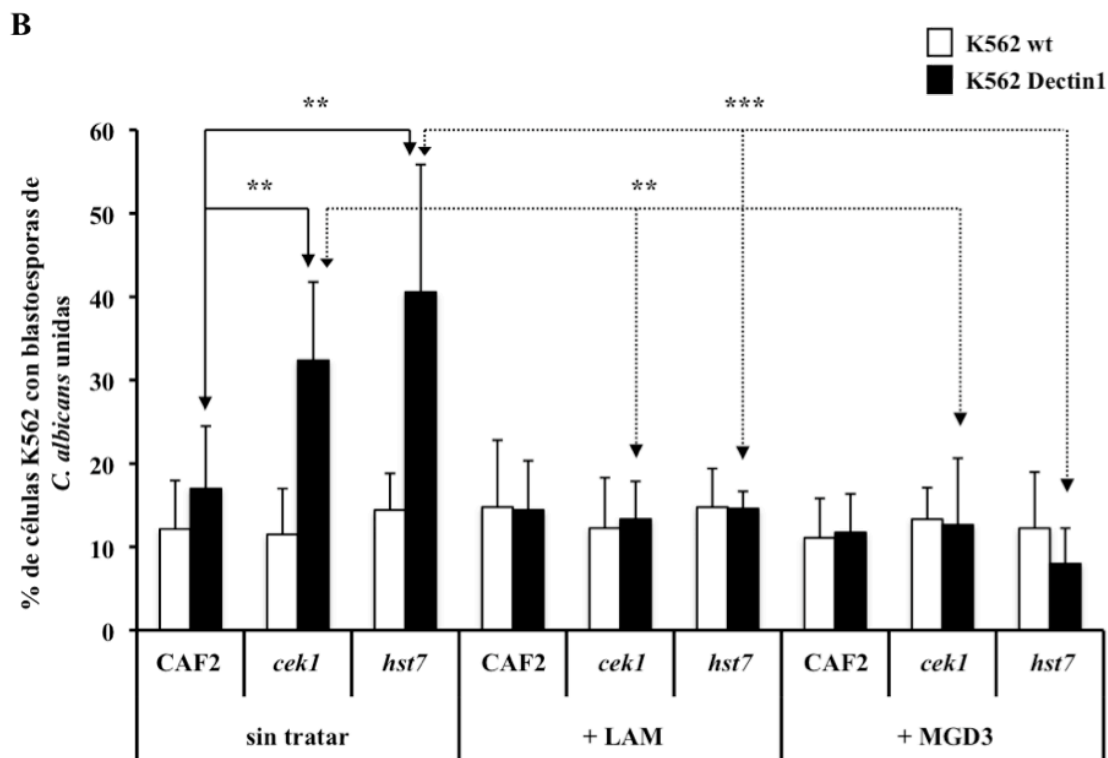


Figura 14. La unión de *C. albicans* dependiente de Dectin-1 se incrementa específicamente en los mutantes de delección *cek1* y *hst7*. A, A la izquierda se muestran los niveles de expresión de Dectin-1 en las células K562 wt y K562-Dectin1 (en gris el mAb control y superpuesto en negro el mAb MGD3) y a la derecha un perfil representativo de citometría de flujo de la unión del mutante *cek1* a las células K562 Dectin1 (histograma gris) y de dicha unión tras el tratamiento previo de las células con el mAb MGD3 (histograma rojo) o con la laminarina (LAM, histograma negro). B, Análisis por citometría de flujo de los niveles de unión de las cepas de *C. albicans* CAF2, *cek1* y *hst7* marcadas con FITC a las células K562 silvestres (K562 wt) o que expresan establemente Dectin-1 (K562 Dectin1). Las barras representan el porcentaje de células con blastosporas unidas (MFI \pm SD de ocho experimentos independientes). El análisis estadístico compara: por una parte, la unión de las dos cepas mutantes a las K562 Dectin1 respecto de la cepa silvestre en ausencia de tratamiento (flechas continuas); y por otro lado, la unión de las dos cepas mutantes respecto de la observada tras el tratamiento previo de las células con la laminarina o con el mAb anti-Dectin-1 MGD3 (flechas punteadas).

Como se muestra en la Figura 14B, los niveles de unión de las células K562-Dectin1 tanto a *cek1* como a *hst7*, eran significativamente superiores a los mostrados por la cepa silvestre CAF2, confirmando los datos obtenidos en el análisis inicial realizado con los mutantes en las cuatro rutas MAPKs de *C. albicans* (Figura 13). Además, tanto la unión al mutante *cek1* como al *hst7* eran bloqueadas en su totalidad y de forma específica, por la laminarina (β -glucano soluble obtenido a partir de *Laminaria digitata* que actúa como antagonista de Dectin-1), así como por el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-Dectin-1 humano generado en el laboratorio (MGD3; ver

Material y Métodos y Anexo 1). Este bloqueo disminuía el reconocimiento hasta alcanzar los niveles basales mostrados por la cepa silvestre (CAF2) o los observados en ausencia del receptor (K562 wt). Estos datos confirmaban la especificidad de la unión a Dectin-1 de los mutantes *cek1* y *hst7* de la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.

OBJETIVO 2: Caracterizar estructural y funcionalmente los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.

2.1.- Determinación de la ultra-estructura de la pared celular de los mutantes.

La alteración de la ruta MAPK mediada por *CEK1* modifica la morfología de la pared celular del hongo.

La ruta MAPK mediada por *CEK1* está implicada en procesos biológicos esenciales para la levadura como son la filamentación y la biogénesis de la pared celular (Eisman et al., 2006; Roman et al., 2005). Concretamente, se ha visto que la MAPK *Cek1* participa en la construcción de la pared celular, ya que mutantes defectivos en esta quinasa o en cualquiera de los otros elementos que median su activación (*Hst7*), muestran sensibilidad a determinados compuestos, como el blanco de calcoflúor o el Rojo Congo, que interfieren con el correcto ensamblaje de la pared celular. Además, se ha comprobado que dicha quinasa es activada durante el crecimiento asociado a la reconstrucción de la pared (Roman et al., 2005). Teniendo en cuenta que todas las cepas mutantes en las distintas MAPKs testadas se unían a las células K562-DC-SIGN de forma comparable (Figura 13), pero que los mutantes *cek1* y *hst7* lo hacían de forma preferencial y específica a las células K562-Dectin-1 (Figura 13 y Figura 14), se puede inferir que existe algún tipo de alteración en el patrón de PAMPs expuestos en la superficie celular de los mutantes de delección *cek1* y *hst7* respecto de la cepa silvestre, que sería la responsable de este incremento en el reconocimiento mediado por Dectin-1. Para tratar de identificar las alteraciones de la pared que pudiesen sufrir estos mutantes

en comparación con la cepa silvestre CAF2, se llevaron a cabo inicialmente estudios de microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM). A pesar de que el grosor de la pared no parecía verse afectado (datos no mostrados), las imágenes de TEM muestran una pared celular menos densa a los electrones en los mutantes *cek1* y *hst7* comparada con la de la cepa silvestre CAF2 (Figura 15A, 15B y 15C). Esta diferencia de densidad en la pared celular de los mutantes, podría explicar en parte la hipersensibilidad mostrada por estos a los diversos agentes que alteran la pared celular, pudiendo también afectar a la detección del hongo por parte del sistema inmune.

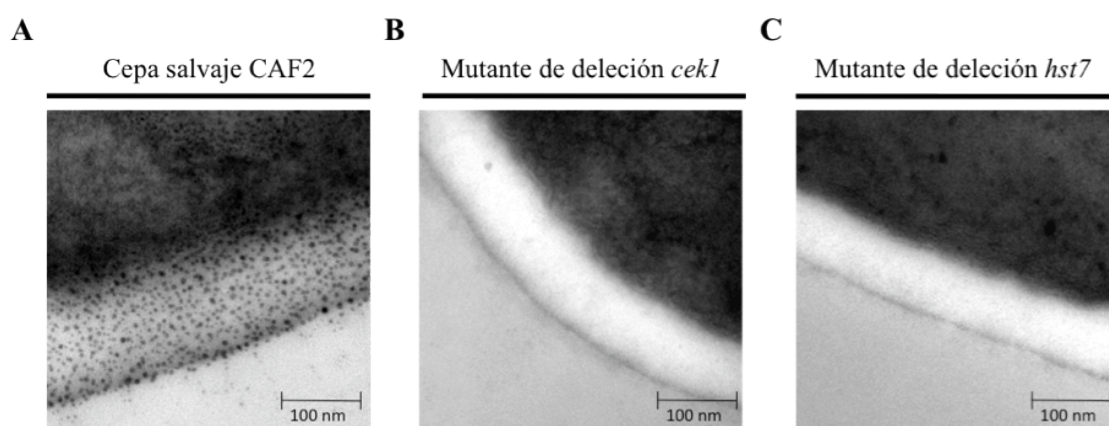


Figura 15. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la morfología de la pared celular de las cepas CAF2 *cek1* y *hst7* de *C. albicans*. A, Imagen TEM correspondiente a la cepa silvestre de *C. albicans* CAF2. B, imagen TEM del mutante de delección *cek1*. C, imagen TEM del mutante de delección *hst7*. Barra de escala: 100 nm

2.2.- Análisis de los niveles de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) expuestos en la pared celular de los mutantes en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*.

La ruta MAPK mediada por *CEK1* determina una mayor exposición de β -glucano en la pared celular fúngica, provocando un aumento en el reconocimiento del hongo mediado por Dectin-1.

En base a la menor densidad a los electrones mostrada por la pared celular de los mutantes de delección en comparación con la cepa silvestre, puesta de manifiesto

mediante el análisis de TEM, se planteó la hipótesis de que dichas diferencias pudiesen reflejar una mayor exposición de β -glucano. Esta hipótesis explicaría también la unión preferencial y específica mostrada por los mutantes *cek1* y *hst7* a los transfectantes estables para Dectin-1 en K562 (Figura 13 y Figura 14). Con el fin de determinar si la mayor unión de dichos mutantes de delección era debida a una mayor cantidad de β -glucano expuesto en la pared celular, se llevaron a cabo análisis mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal anti- β -(1,3)-glucano (ver Material y Métodos). Los resultados revelaron que la exposición de dicho PAMP es significativamente mayor en los mutantes de delección *cek1* y *hst7*, comparada con la de CAF2 (Figura 16A y 16B). Como controles positivos se usaron levaduras matadas por calor, ya que está descrito que este tratamiento origina una mayor exposición de β -glucano en la pared celular (entre otros componentes) (Gantner et al., 2005; Wheeler and Fink, 2006). Dado que Dectin-1 es el principal receptor de β -glucanos no opsonizados (Brown and Gordon, 2001), con el fin de analizar si los mutantes *cek1* y *hst7* eran reconocidos de forma más eficiente que la cepa silvestre por dicho PRR, se diseñó una proteína soluble de Dectin-1 fusionada al Fc humano, que se usó para la tinción de la pared celular de manera análoga al uso del mAb (ver Material y Métodos). El análisis mediante citometría de flujo reveló que la proteína soluble (sDectinFc) se unía más eficientemente a los mutantes *cek1* y *hst7*, indicando que Dectin-1 es capaz de reconocer específicamente el β -glucano expuesto en la pared celular de *C. albicans*. Estos resultados confirmaban la significativamente mayor exposición de dicho PAMP en la pared celular de los mutantes de delección de la ruta mediada por *CEK1*, en comparación con la mostrada por CAF2 (Figura 16A y 16B). Por tanto, el análisis mediante citometría de flujo demostraba que la alteración en la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*, provocaba una exposición de β -glucano aumentada, así como un mayor reconocimiento por parte del receptor humano Dectin-1.

Posteriormente, se realizó un análisis más exhaustivo de la distribución del β -glucano en la pared celular del hongo mediante técnicas de microscopía confocal, usando de nuevo el mAb anti- β -(1,3)-glucano y la proteína soluble sDectinFc. Dicho análisis puso de manifiesto que mientras que en la cepa silvestre, el β -glucano mostraba un patrón restringido a pequeñas zonas aisladas, que se correspondían con las regiones septales que aparecen entre las células madre e hija (Gantner et al., 2005), en los mutantes de delección *cek1* y *hst7*, el β -glucano se exponía por toda la superficie de la pared celular (Figura 17).

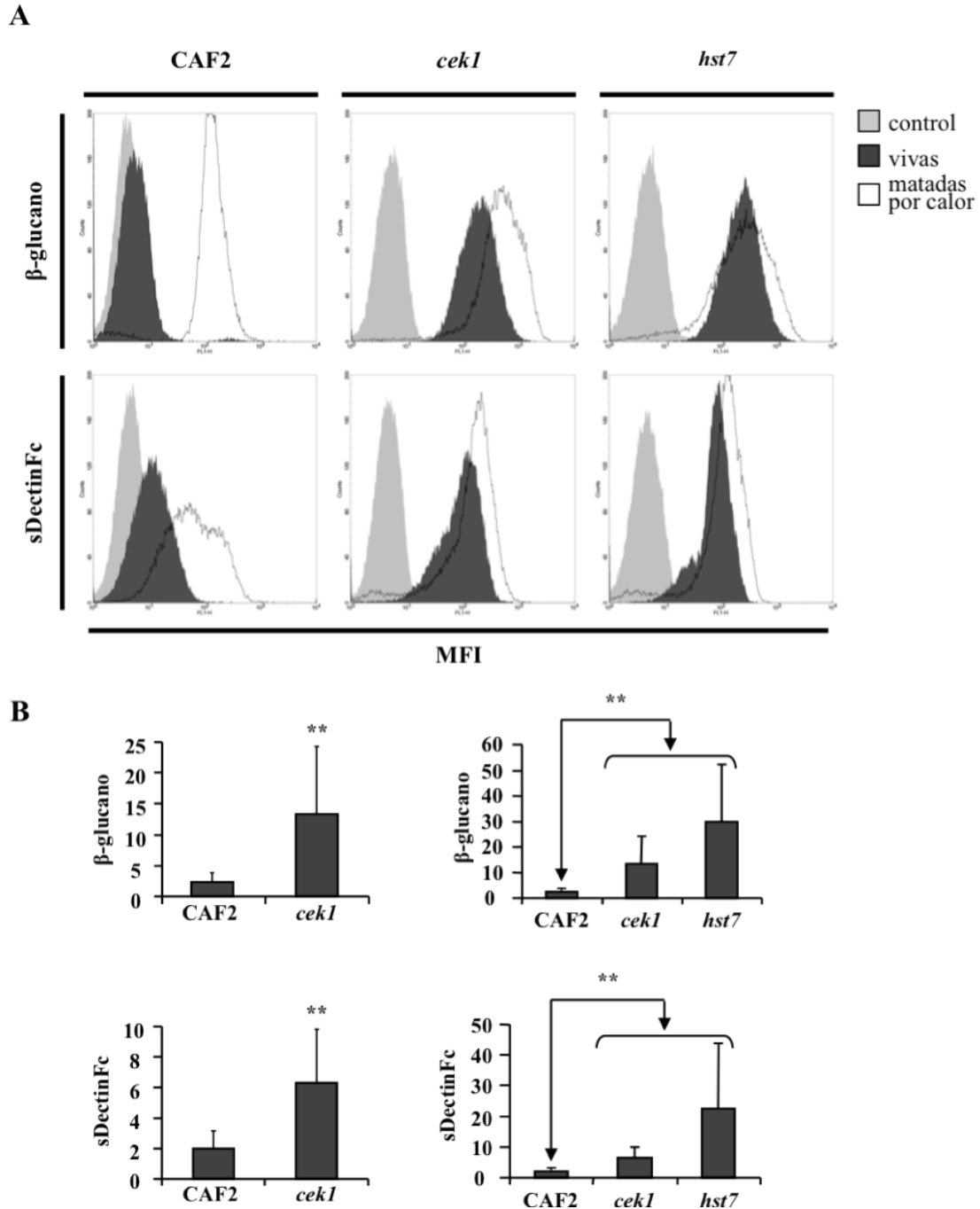


Figura 16. La delección de *Cek1* o de *Hst7* provoca una mayor exposición de β -glucano en la pared celular, induciendo un aumento en el reconocimiento mediado por Dectin-1. A, Imágenes representativas del análisis mediante citometría de flujo de blastoesporas vivas de *C. albicans* de la cepa silvestre CAF2 y de las cepas mutantes *cek1* y *hst7*. En gris claro se muestran los histogramas correspondientes al anticuerpo control; en gris oscuro el mAb anti- β -(1,3)-glucano en la fila superior, o bien la proteína soluble sDectinFc en la fila inferior. El histograma vacío superpuesto en negro, muestra el control positivo correspondiente a levaduras matadas por calor. B, Análisis estadístico que representa la MFI \pm SD tras la sustracción de la MFI del Ab control, para las tinciones realizadas con el mAb anti- β -glucano (gráficas superiores) o con sDectinFc (gráficas inferiores). A la izquierda se muestra el análisis estadístico comparativo entre la cepa silvestre y el mutante *cek1* y a la derecha este mismo análisis comparando las tres cepas usadas.

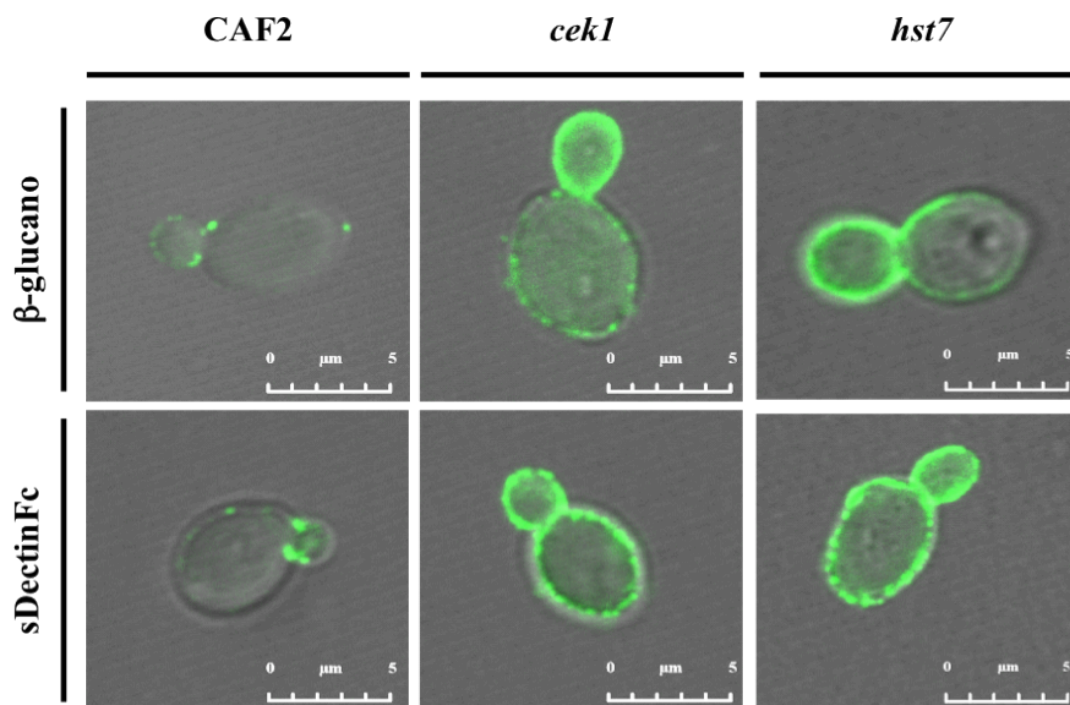


Figura 17. Caracterización de la localización del β -glucano expuesto en la pared celular de la cepa silvestre y de los mutantes en la ruta MAPK mediada *CEK1* de *C. albicans*. Análisis mediante microscopía confocal de blastoesporas individuales de la cepa silvestre (CAF2) y de los mutantes de delección (*cek1* y *hst7*). Se muestra la superposición de imágenes de fluorescencia y de contraste de interferencia diferencial (*Differential interference contrast microscopy*, DIC o Nomarski) para un plano en Z, tras la tinción con el anticuerpo monoclonal anti- β -(1,3)-glucano (fila superior) o con la proteína soluble sDectinFc (fila inferior), seguidos de un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa-488. Barra de escala: 5 μ m.

Para profundizar en el análisis de la disposición del β -glucano en la pared celular, se llevó a cabo una reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de las distintas cepas. Dicha reconstrucción corroboró que en la cepa silvestre, el mAb anti- β -(1,3)-glucano teñía únicamente las zonas septales y las nuevas blastoesporas hijas, mientras que presentaba una tinción homogénea por toda la pared celular en los mutantes de delección (*cek1* y *hst7*). Además del patrón deslocalizado a lo largo de toda la pared celular de los mutantes, el mAb mostraba una tinción preferencial y más intensa en las cicatrices de gemación, indicando que el β -glucano queda expuesto principalmente en dichas estructuras superficiales (flechas en la Figura 18). Por su parte, la proteína soluble sDectinFc revelaba un patrón de reconocimiento más parcheado que el del mAb, pero igualmente específico, reconociendo sólo las zonas septales en la cepa silvestre y toda la pared celular en los mutantes de delección (Figura 18).

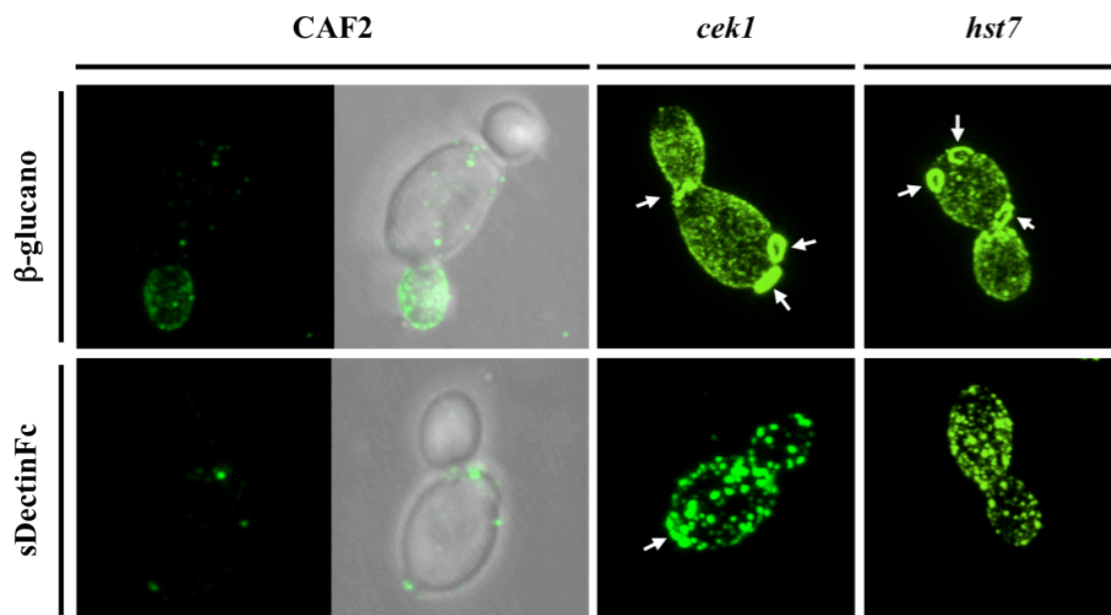


Figura 18. La delección de la MAPK *Cek1* o de la MAPKK *Hst7* provocan una mayor exposición de β -glucano y un aumento en el reconocimiento mediado por Dectin-1, localizados preferencialmente en las zonas septales así como en las cicatrices de gemación. Análisis de microscopía confocal de blastoesporas individuales de la cepa salvaje (CAF2) y de los mutantes de delección (*cek1* y *hst7*) teñidos con el mAb anti- β -(1,3)-glucano (fila superior) o con la proteína soluble sDectinFc (fila inferior), seguidos de un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa-488. Se muestra la reconstrucción tridimensional de las imágenes de fluorescencia del plano Z. En el caso de la cepa silvestre CAF2, se muestran también las imágenes superpuestas de fluorescencia y DIC para poder diferenciar el contorno de la espora. Las flechas indican zonas intensamente teñidas que se corresponden con las cicatrices de gemación y las zonas septales entre madre e hija.

Todos los resultados mostrados hasta aquí apoyan la hipótesis de que la alteración de la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans* induce una mayor exposición del β -glucano en la pared celular fúngica. Por otra parte, el hecho de que los mutantes de dicha ruta se unan al transfectante estable de DC-SIGN de forma similar (Figura 13) podría indicar que, aunque sí existe una variación en la exposición del β -glucano, el contenido de manoproteínas no se viera alterado en los mutantes. Para tratar de dilucidar si dicho contenido en manoproteínas se veía también afectado por la delección de *CEK1*, se realizaron ensayos de citometría de flujo usando Concanavalina A para teñir la pared celular de ambas cepas. La Concanavalina A (Con A) es una lectina vegetal capaz de aglutinar diversos tipos celulares, desde eritrocitos humanos hasta células fúngicas y que además de inducir la mitosis en linfocitos, es empleada también para identificar glicoproteínas y polisacáridos debido a su unión a restos de D-glucosa y D-manosa. Puesto que el uso de Con A conjugada a FITC ha sido previamente usado

para la tinción específica de los mananos fúngicos (Cassone et al., 1978; Tkacz et al., 1971), se empleó dicha técnica para analizar si existían variaciones en el contenido en mananos de las paredes celulares de la cepa silvestre y del mutante de delección *cek1*. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas en la tinción con Con A de ambos tipos de levaduras que apoyasen una exposición de manano diferencial entre ellas (Figuras 19A y 19B). Estos resultados confirmaron los datos obtenidos para la unión de las levaduras a DC-SIGN (Figura 13), y corroboraron que la alteración de la ruta MAPK mediada por *CEK1* induce de forma específica el incremento de la exposición de β -glucano en la pared celular de *C. albicans*.

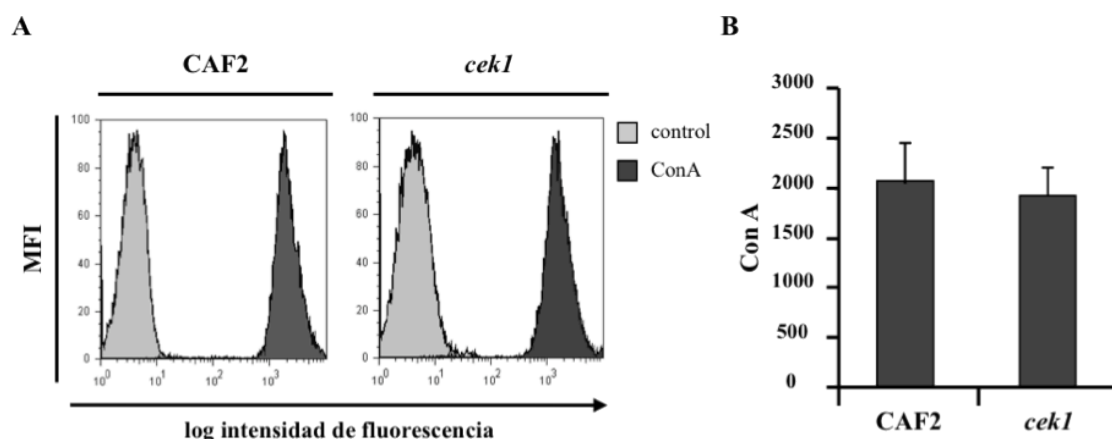


Figura 19. La delección de la MAPK Cek1 no altera el contenido en manoproteínas de la pared celular. A, Imagen representativa del análisis mediante citometría de flujo del contenido en manoproteínas de la pared celular de blastoesporas vivas de *C. albicans* de la cepa mutante *cek1* y la silvestre CAF2. En gris claro se muestran los histogramas correspondientes al control negativo (blastoesporas sin ConA) y en gris oscuro la tinción con Concanavalina A conjugada a Alexa-488 (ConA). B, El análisis estadístico representa la MFI \pm SD de cinco experimentos independientes (los datos no son significativos salvo si se indica lo contrario).

En su conjunto, los resultados obtenidos demostraban que, tanto la delección de Cek1, como la de la MAP quinasa que la fosforila Hst7, provocan una mayor exposición de β -glucano en la pared celular de las levaduras que va acompañada de un mayor reconocimiento del hongo por parte de Dectin-1. Es decir, que colectivamente, estos datos implican a la ruta MAPK mediada por *CEK1* en el control de la exposición del β -glucano en la pared celular del hongo.

OBJETIVO 3: Analizar las consecuencias funcionales que tiene la delección de la MAPK Cek1 de *C. albicans* sobre la respuesta inmune.

El análisis de las consecuencias funcionales que tiene la alteración de la ruta MAPK mediada por *CEK1*, se centró exclusivamente en el mutante de delección de la MAPK Cek1. Puesto que Hst7 es la MAPKK que fosforila a Cek1, dado que la MAPK es el último elemento de la ruta, y una vez comprobado que el fenotipo de *cek1* es también se observa también en *hst7*, pueden asumirse como extrapolables los resultados obtenidos con el mutante *cek1* para el mutante *hst7*.

3.1.- Análisis de las respuestas específicas mediadas por Dectin-1 en respuesta al mutante *cek1* en células primarias humanas (hDCs y hMΦs).

La delección de *CEK1* provoca un incremento de la fagocitosis y de la susceptibilidad del hongo a los fagocitos humanos.

Los macrófagos (MΦs) y las células dendríticas (DCs) están estratégicamente situadas en los sitios de entrada de *Candida* como las mucosas o la piel, siendo por tanto esenciales para el inicio de la respuesta inmune innata. Por otra parte, la fagocitosis facilita la eliminación de los patógenos a la vez que permite activar y determinar la posterior respuesta inmune adaptativa (Herre et al., 2004). Por tanto, con el fin de evaluar la relevancia fisiológica que pudiese tener la mayor exposición de β-glucano mostrada por el mutante *cek1*, se analizaron los niveles de fagocitosis de dicho mutante y de la cepa silvestre en las DCs y los MΦs humanos derivados de monocitos (denominados hDCs y hMΦs, respectivamente). El índice fagocítico se calculó contando el número de levaduras internalizadas por cada cien fagocitos y fue determinado mediante ensayos de inmunofluorescencia, utilizando técnicas de microscopía confocal. Para discriminar las blastoesporas que estaban adheridas pero no internalizadas, las levaduras fueron marcadas con un anticuerpo policlonal anti-*C. albicans* seguido de un Ab secundario acoplado al fluorocromo Alexa-647, sin

permeabilizar previamente las células. Puesto que todas las levaduras utilizadas estaban previamente marcadas con FITC, solamente las extracelulares eran visualizadas en azul, y las verdes, pero no azules, correspondían a levaduras fagocitadas (ver Material y Métodos para una descripción más detallada del método de tinción empleado) (Figura 20A y 20B).

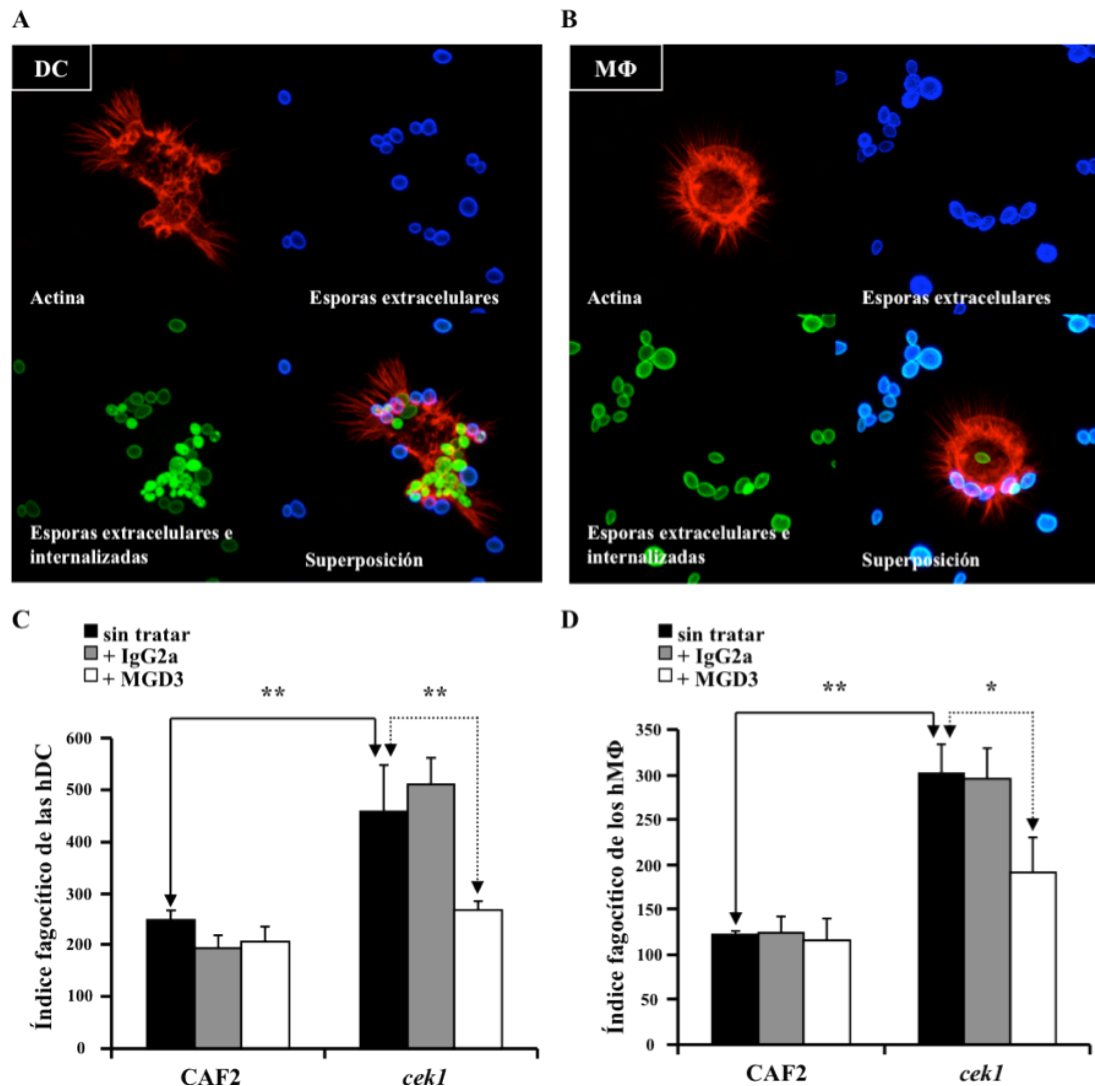


Figura 20. Análisis de la fagocitosis de *C. albicans* llevada a cabo por los macrófagos y las células dendríticas humanas derivadas de monocitos (hDCs y hMΦs). Imágenes de microscopía confocal de las hDCs (A) o los hMΦs (B) mostrando las levaduras extracelulares (azul), las extracelulares e internalizadas (verde) y los filamentos celulares de actina (rojo). C-D, Índice fagocítico de las hDCs (C) o los hMΦs (D) co-cultivados con las distintas cepas y cuantificado mediante marcaje diferencial por inmunofluorescencia. Los datos corresponden al menos a tres experimentos independientes. El análisis estadístico compara: por una parte los índices fagocíticos de las hDCs o los hMΦs para CAF2 *versus* cek1 (flechas continuas) y por otra parte, el índice fagocítico de las células primarias tras los distintos tratamientos de bloqueo, para la cepa mutante (flechas punteadas).

En ambos tipos celulares, el índice fagocítico mostrado para el mutante *cek1* fue aproximadamente el doble que el de la cepa silvestre CAF2, aunque las hDCs mostraron una mayor eficiencia fagocítica comparadas con los hMΦs (Figura 20C y 20D). El tratamiento previo de las células con el mAb anti-Dectin-1 (MGD3) no afectó a la captación de la cepa silvestre CAF2, mientras que la fagocitosis del mutante *cek1* se redujo notablemente. Curiosamente, el mAb MGD3 era capaz de inhibir la fagocitosis tanto de las hDCs como de los hMΦs, aunque mostró mayor efectividad en las hDCs. (Figura 20C y 20D).

En cuanto a las consecuencias que pudiera tener la alteración de la ruta mediada por *CEK1* en la supervivencia del propio patógeno, se analizó la viabilidad del mismo tras su exposición a las células inmunes. Los ensayos de aniquilamiento o eliminación (*killing*) demostraron que el mutante *cek1* era hasta tres veces más susceptible a las hDCs que la cepa silvestre (Figura 21A). Sin embargo, ambas cepas mostraron una susceptibilidad similar al aniquilamiento o eliminación mediados por los hMΦs (Figura 21B), de acuerdo con resultados previamente publicados (Arana et al., 2007).

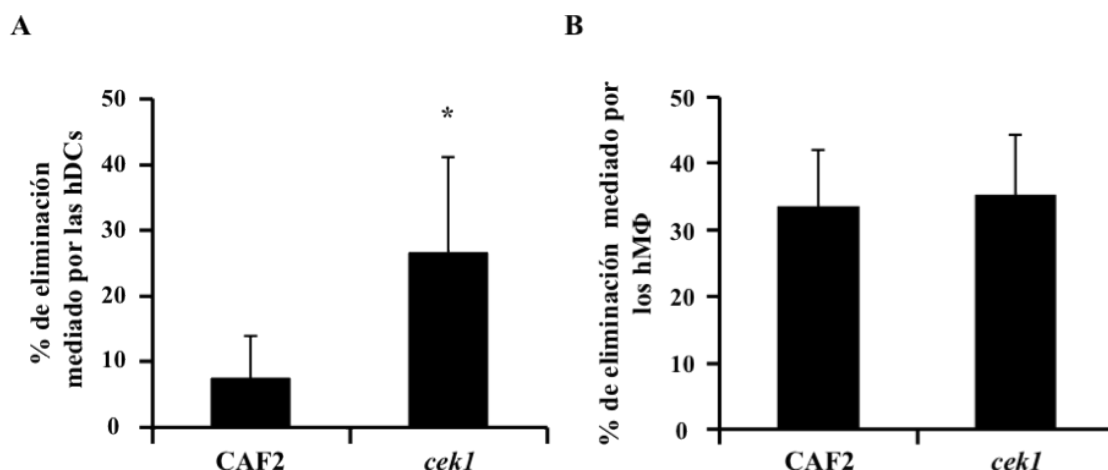


Figura 21. Análisis de la resistencia de *C. albicans* al ataque mediado por los macrófagos y las células dendríticas humanas derivadas de monocitos. Ensayos de eliminación o *killing* de CAF2 y *cek1* por las hDCs (A) o los hMΦs (B) tras 4 h. de co-cultivo (1 levadura: 20 fagocitos). El porcentaje de eliminación de cada cepa se expresó como el porcentaje de reducción de unidades formadoras de colonias (CFUs) de los co-cultivos de las hDCs o los hMΦs con las levaduras *versus* co-cultivos simultáneos de blastoesporas en ausencia de fagocitos. Los datos se expresan como la media \pm la SD de al menos cinco experimentos independientes con distintos donantes.

En su conjunto, estos datos sugieren que el aumento en la exposición de β -glucano en la pared celular inducido por la delección del gen *CEK1*, favorece el reconocimiento y la fagocitosis del hongo mediadas por Dectin-1, tanto en hDCs como en hMΦs, provocando además un aumento en la susceptibilidad del hongo frente a la eliminación mediada por las hDCs.

El mutante de delección *cek1* promueve la fosforilación de las quinasas Syk, Raf-1 y ERK, induciendo la degradación de I- κ B en hDCs y disparando la activación de AP-1 a través de Dectin-1.

Para determinar las bases moleculares que subyacen al reconocimiento diferencial de las cepas de *C. albicans* en estudio por parte de los fagocitos humanos, se analizaron las rutas de señalización dependientes de Dectin-1 en hDCs expuestas a la cepa silvestre y al mutante de delección. La fosforilación de Syk sólo se observó tras la estimulación de las hDCs con el mutante *cek1* (Figura 22). Asimismo, al contrario de lo que ocurrió con la cepa silvestre que estimulaba la fosforilación temprana pero breve de ERK, el mutante *cek1* promovió una mayor activación de esta quinasa, que además se mantenía durante más tiempo (Figura 22). Al mismo tiempo y en concordancia con un reciente estudio sobre la activación de Raf-1 dependiente de Dectin-1 (Gringhuis et al., 2009), el mutante *cek1* activó la ruta de señalización dependiente de Raf-1 de forma más eficiente de lo que lo hacía la cepa silvestre (Figura 22).

El reconocimiento y la captación de *C. albicans* mediados por Dectin-1 tienen como resultado final la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de rutas de señalización dependientes de las quinasas Syk y Raf-1. Las señales que inducen la activación de NF- κ B, provocan la fosforilación del inhibidor de κ B (I- κ B) que se encuentra secuestrando al factor de transcripción en el citoplasma y bloqueando sus sitios de unión al ADN. Cuando dicho inhibidor es fosforilado, se disocia y es degradado por el proteosoma, liberando a NF- κ B, que a su vez migra al núcleo, donde activa la transcripción génica (Figura 8). Por tanto, para analizar de forma indirecta si NF- κ B estaba siendo diferencialmente activado, se estudió la degradación de I- κ B- α en hDCs expuestas a las distintas cepas de *C. albicans*. Los resultados mostraron que tan sólo la cepa mutante *cek1* era capaz de inducir la degradación tardía (30 min.) de I- κ B,

lo que indirectamente indica que, bajo estas condiciones experimentales, sólo esta cepa es capaz inducir la activación de NF- κ B (Figura 22, panel inferior).

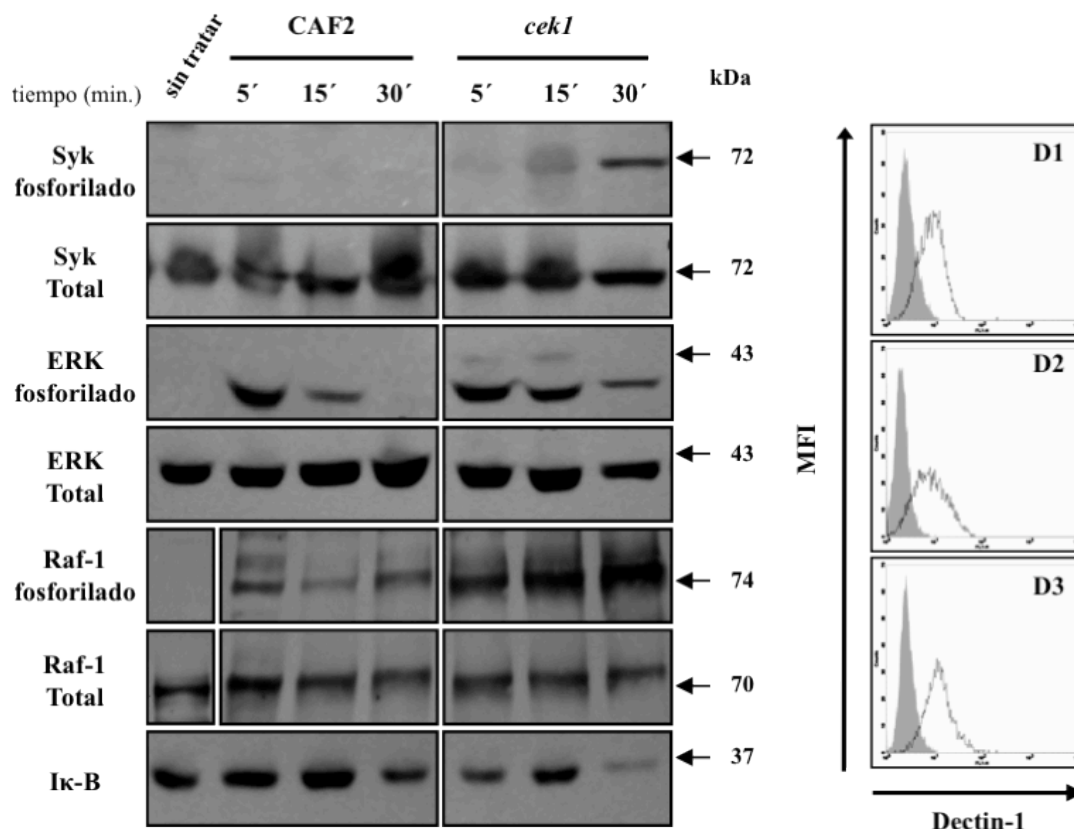


Figura 22. La delección de *CEK1* induce la fosforilación de las quinasas Syk, ERK y Raf-1 provocando la degradación de I- κ B en hDCs. Análisis por Western Blot de lisados celulares de hDCs co-cultivadas con cepas vivas de *C. albicans* (10 levaduras: 1 célula) y detectados con Abs contra las formas fosforiladas de Syk, ERK y Raf-1 (Syk/ERK/Raf-1 fosforilados) *versus* los Abs contra las proteínas quinasas totales (Syk/ERK/Raf-1-Total). El panel inferior muestra la degradación de I- κ B usando un Ab contra la subunidad alfa del inhibidor (I- κ B- α). El análisis es representativo de al menos tres donantes distintos. A la derecha se muestran los niveles de expresión de Dectin-1 por citometría de flujo para tres de estos donantes (D1-D3) (el histograma gris representa el Ab control y el negro el mAb anti-Dectin-1 MGD3).

Finalmente, puesto que estudios previos habían descrito la activación del factor de transcripción AP-1 (*Activator Protein 1*) a través de la ruta Dectin-1/Syk durante la infección fúngica (Fujioka et al., 2004; Toyotome et al., 2008), se analizó el efecto del mutante *cek1* sobre la activación dependiente de Dectin-1 de dicho factor de transcripción. Con el fin de evitar la transición blastoespora-hifa durante el experimento y para minimizar la muerte celular, se usaron blastoesporas inactivadas con luz UV

(Wheeler and Fink, 2006). Se realizó un estudio previo del número de dosis necesarias para inactivar el hongo, minimizando la alteración de la pared celular y el consiguiente desenmascaramiento de β -glucano. A diferencia del método usado por Wheeler *et al.*, por el cual inactivaban las levaduras exponiéndolas a cuatro dosis de luz UV, se comprobó como una dosis única de radiación UV mantenía más intacta la arquitectura de la pared celular del hongo, y que cuanto mayor era el número de dosis de radiación UV aplicadas, mayor era también la exposición del β -glucano en la pared celular del hongo (Figura 25).

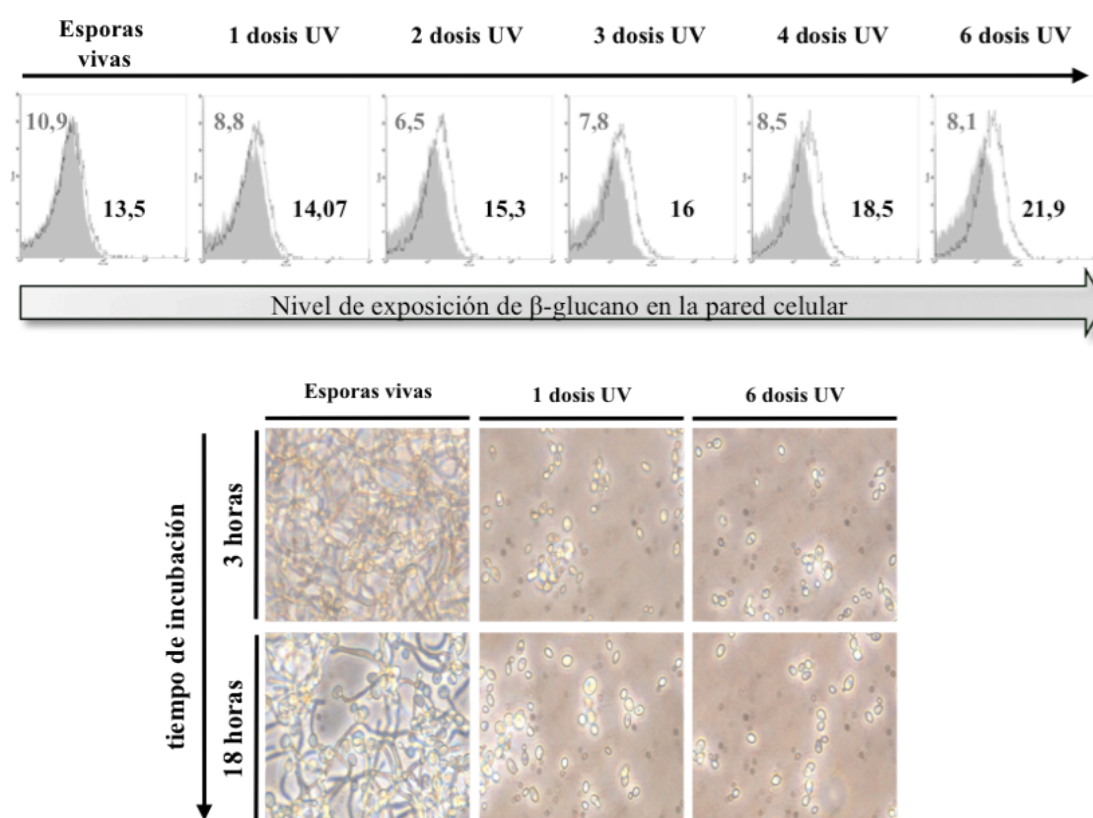


Figura 23. Una dosis única de radiación ultravioleta (UV) es suficiente para inactivar la germinación de *C. albicans* manteniendo la exposición de β -glucano en la pared celular lo más intacta posible. En la parte superior de la figura se muestran los histogramas de citometría de flujo para los niveles de expresión de β -glucano en levaduras de la cepa silvestre, vivas e inactivadas con distintas dosis de luz ultravioleta (UV). Los histogramas rellenos grises corresponden a blastoesporas teñidas con un mAb control y los histogramas vacíos, superpuestos en negro, muestran la tinción con el mAb anti- β -(1,3)-glucano. Junto a los histogramas se muestran los valores de las MFIs para los controles (números en gris) y para el mAb anti- β -(1,3)-glucano (números negros). En la parte inferior se muestran imágenes de contraste de fase de microscopía convencional para levaduras silvestres cultivadas a 37° C en medio DMEM suplementado con 10% de FCS y a distintos tiempos de incubación (3-18 h.).

Los ensayos de luciferasa llevados a cabo en la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con Dectin-1 mostraron que el mutante *cek1* induce la activación de AP-1 de forma más eficiente que la cepa silvestre CAF2 (Figura 24). Como era predecible, ni la estimulación con blastoesporas de *C. albicans* ni con zymosan fueron capaces de inducir la activación de AP-1 en las HEK293T transfectadas con el plásmido vacío. Estos resultados indicaban que el mutante *cek1* inducía la activación de AP-1 de forma dependiente de Dectin-1.

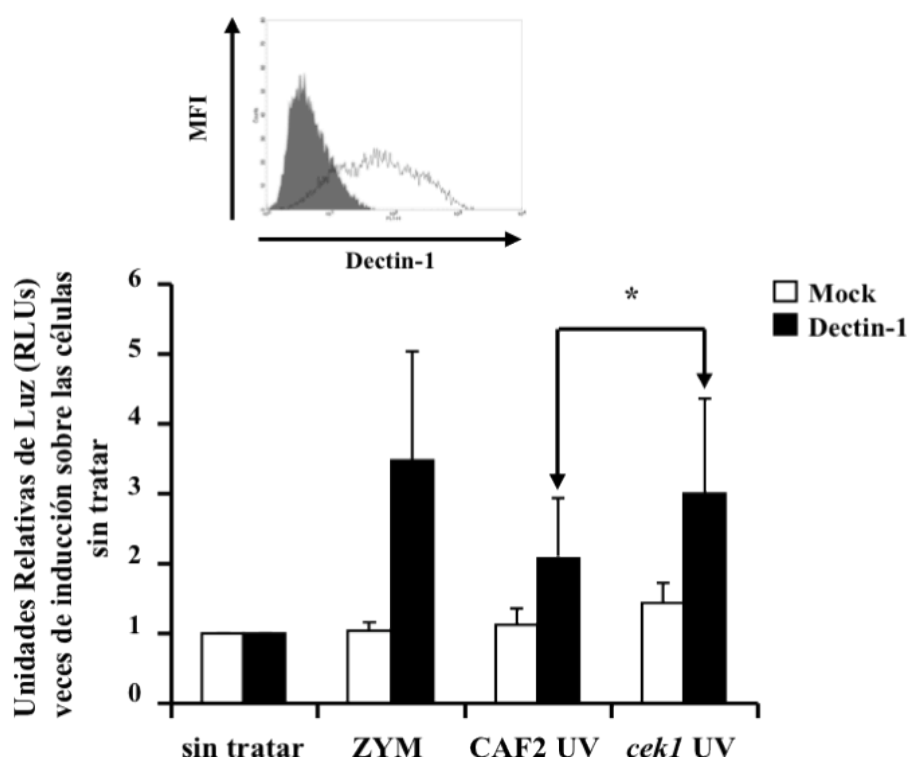


Figura 24. La delección de *CEK1* induce la activación de AP-1 dependiente de Dectin-1 en células transfectadas. Ensayo de la actividad luciferasa de células HEK293T transfectadas transitoriamente con los plásmidos indicados (*Mock*: vacío; *Dectin-1*: portador de Dectin-1) tras la co-incubación con zymosan o con blastoesporas de *C. albicans* inactivadas por luz UV. Las barras representan unidades relativas expresadas como la media \pm S.D de cinco experimentos independientes, cada uno por duplicado. El análisis estadístico compara la inducción de la actividad luciferasa de las células HEK293T-Dectin-1 expuestas a la cepa silvestre *versus* las expuestas a la cepa mutante. En la parte superior se muestra un perfil de citometría de flujo de las células HEK293T-Dectin-1 transfectadas (histograma gris: Ab control; histograma negro: mAb anti-Dectin-1 MGD3).

En conjunto, el análisis de estos resultados permite concluir que la alteración de la ruta MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans* provoca una activación más eficiente de las rutas de señalización intracelulares mediadas por Dectin-1.

La delección del gen *CEK1* provoca un incremento en la respuesta oxidativa así como en la síntesis de citoquinas dependiente de Dectin-1.

Además de la unión, la fagocitosis, la eliminación del hongo y la señalización intracelular, la interacción entre *C. albicans* y los fagocitos provoca en última instancia un “estallido respiratorio” (*respiratory burst*), así como la activación de la secreción de citoquinas (Romani, 2004). En base a esto, a continuación se testó la habilidad del mutante *cek1* en comparación con la cepa silvestre (inactivadas ambas con luz UV) para inducir la respuesta oxidativa en la línea celular macrofágica de ratón RAW 264.7. El mutante de delección *cek1* promovía un incremento significativo en la secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con la inducida por la cepa silvestre (Figura 25).

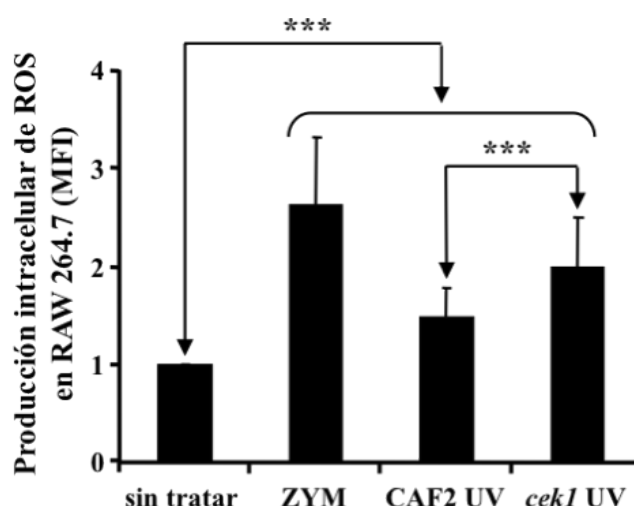


Figura 25. El mutante *cek1* de *C. albicans* induce una mayor respuesta oxidativa en macrófagos RAW 264.7. Análisis de la secreción intracelular de ROS en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 co-cultivados con blastoesporas inactivadas con luz UV (10 levaduras: 1 célula). El análisis estadístico se representa con asteriscos que indican diferencias significativas entre las células tratadas y sin tratar (corchete) o entre las células expuestas a *cek1* y las expuestas a CAF2. La producción de ROS se representa como la media \pm SD de siete experimentos independientes por triplicado.

Estos resultados fueron corroborados posteriormente en células humanas primarias, hMΦs y hDCs. De manera análoga a lo que ocurrió en los macrófagos de ratón, el mutante *cek1* provocó en ambos tipos de fagocitos humanos, un ligero pero

significativo incremento en la secreción de ROS en comparación con la inducida por CAF2 (Figura 26A y 26B).

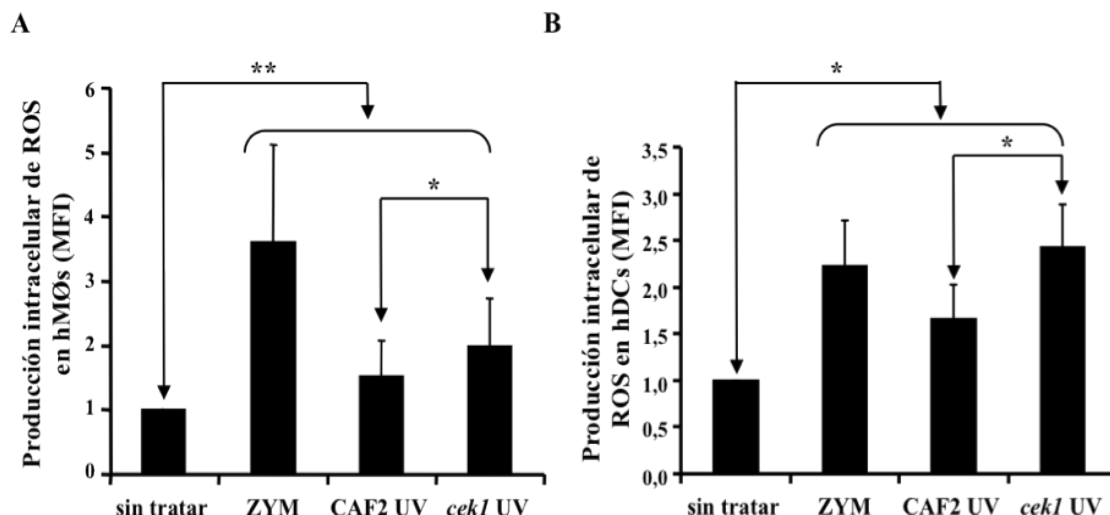


Figura 26. El mutante *cek1* de *C. albicans* induce una mayor respuesta oxidativa en fagocitos primarios humanos. Análisis de la secreción intracelular de ROS en hMΦs (A) y hDCs (B) co-cultivados con blastoesporas inactivadas con luz UV (10 levaduras: 1 célula). El análisis estadístico se representa con asteriscos que indican diferencias significativas entre las células tratadas y sin tratar (corchete) o entre las células expuestas a *cek1* y las expuestas a CAF2. La producción de ROS se representa como la media \pm SD de al menos cinco donantes distintos por duplicado.

Finalmente, dado que muchos de los estímulos que activan la respuesta oxidativa en los fagocitos inducen también la fosforilación de ERK (Forman et al., 2002) y puesto que lo mismo ocurre tras la activación de la ruta de Syk dependiente de Dectin-1 en hDCs (Figura 22), que también provoca la inducción de la secreción de citoquinas (Dillon et al., 2006; Slack et al., 2007), se evaluó el efecto que provocaba el mutante *cek1* respecto de la cepa silvestre en la síntesis de citoquinas por parte de las hDCs. Los resultados mostraron que, en las hDCs tratadas con blastoesporas inactivadas con una única dosis de luz UV, el mutante *cek1* promovió un leve pero significativo aumento en la secreción de TNF α en comparación con la cepa silvestre (Figura 27). Las esporas matadas por calor (*heat-killed*: hk) inducían una secreción de TNF α mucho mayor, comparable a las expuestas a zymosan, pero en la que las diferencias entre las cepas se atenuaban (Figura 27). Estos datos concuerdan con los estudios previamente publicados sobre la exposición total de β -glucano en la superficie de la levadura

provocada por el tratamiento por calor (Gantner et al., 2005; Gow et al., 2007; Wheeler and Fink, 2006). Además, estos resultados ponen de relieve la gran diferencia existente entre la respuesta inducida tras la exposición a zymosan o a esporas con la pared celular alterada, respecto de la inducida por levaduras en las que la pared celular se mantiene lo más intacta posible (una única dosis de tratamiento con luz UV, ver Figura 23).

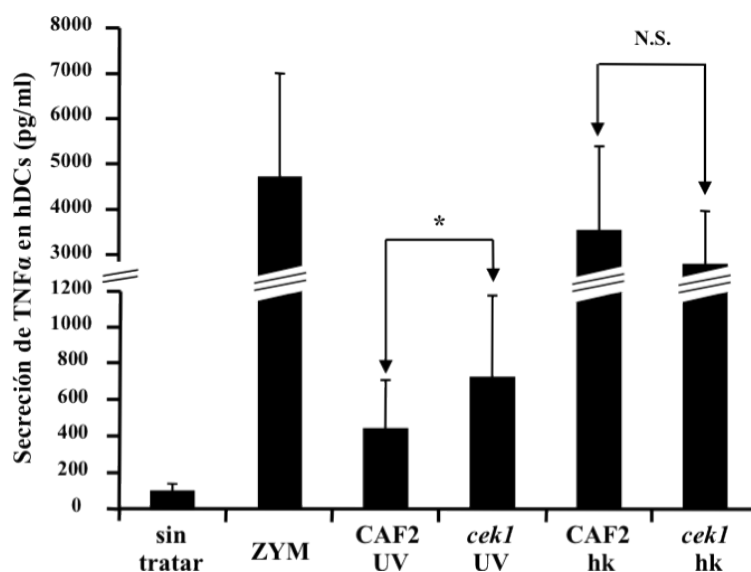


Figura 27. El tratamiento por calor de las blastoesporas de *C. albicans* induce una secreción exacerbada de TNFα, comparable a la inducida por el zymosan. Valores medios de secreción de TNFα en hDCs estimuladas con zymosan, blastoesporas inactivadas por radiación UV o matadas por calor (hk) (50 levaduras: 1 célula). Los datos son representativos de nueve donantes distintos (media ± SD).

Para analizar si esta secreción de citoquinas era dependiente de Dectin-1, se realizó el mismo tipo de ensayo, pero en presencia del mAb anti-Dectin-1 humano MGD3 o de su control de isotipo (IgG2a). Se observó que el mAb MGD3 bloqueaba la secreción temprana (6h) de TNFα inducida por ambas levaduras (Figura 28A). Se analizó en paralelo la secreción de IL-10 a tiempos más largos (18h) y se observó que de nuevo, las levaduras deficientes en la MAPK Cek1 inducían una mayor secreción de IL-10 que la inducida por la cepa silvestre CAF2 (Figura 28B) y que además este efecto se inhibía con el mAb MGD3. Por tanto, se puede concluir que las hDCs son capaces de detectar tanto a la cepa silvestre como al mutante de delección *cek1*, induciendo de forma temprana la secreción de TNFα y de forma más tardía la de IL-10. Esta secreción de

citoquinas, aunque tan sólo ligeramente, era mayor en respuesta al mutante *cek1* que a la cepa silvestre, pero dependiente en ambos casos de Dectin-1.

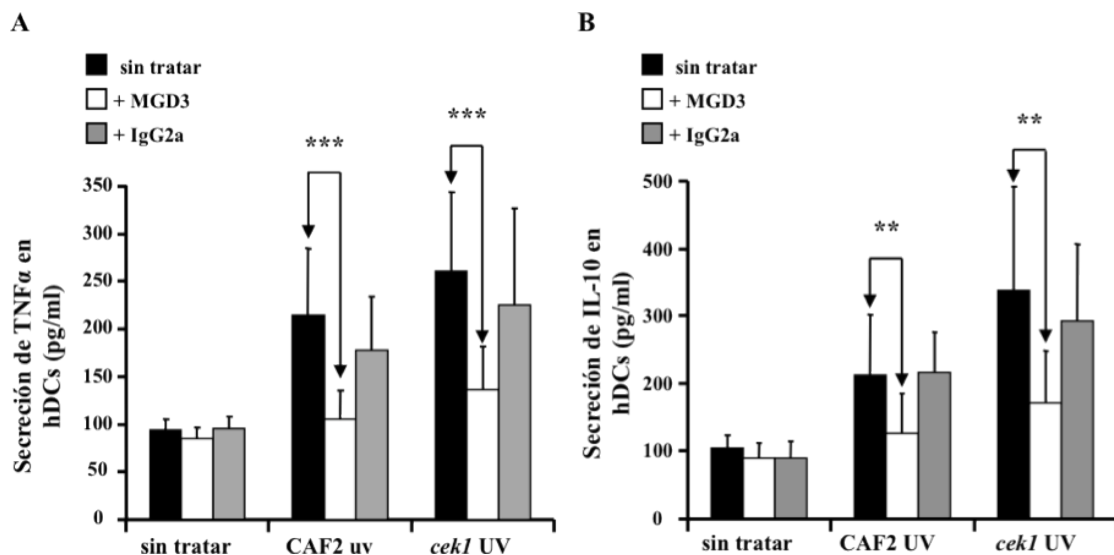


Figura 28. El mutante *cek1* de *C. albicans* provoca un aumento en la secreción de citoquinas dependiente de Dectin-1, mediada por las hDCs. Valores medios de la secreción de TNFα (6h, A) e IL-10 (18h, B) por hDCs estimuladas con blastoesporas inactivadas por luz UV (10 levaduras: 1hDC) en presencia o no del mAb anti-Dectin-1 humano MGD3 o del control de isotipo (IgG2a). Los resultados mostrados son la media de seis donantes independientes y están expresados como media \pm SD (pg/ml). Los datos no son significativos salvo si se indica lo contrario.

Colectivamente, los resultados aquí presentados indican que en comparación con la cepa silvestre, la delección de la MAPK Cek1 de *C. albicans* provoca un aumento de todas las respuestas inmunes celulares hasta ahora ligadas o dependientes de Dectin-1, estableciendo por tanto la ruta MAPK mediada por *CEK1* como una diana potencial para la modulación de la respuesta inmune antifúngica.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El estudio de las relaciones entre el huésped y el microbio, particularmente en el caso de los patógenos víricos y bacterianos, ha contribuido de forma esencial al conocimiento actual acerca de los mecanismos implicados en la respuesta inmune. A pesar de que los hongos y sus componentes son reconocidos clásicamente como potentes inmunomoduladores, hasta que la prevalencia y severidad de las infecciones causadas por hongos no ha sufrido un repunte como el vivido en las últimas décadas (debido en gran parte a las terapias inmunosupresoras y a la infección por VIH), el estudio de las infecciones fúngicas no ha centrado la atención de la comunidad científica. Actualmente, dichos estudios están siendo objeto de un intenso análisis que está permitiendo aportar nuevos puntos de vista sobre el funcionamiento del sistema inmune, que pueden dar lugar a nuevas estrategias para el control de las infecciones microbianas. Esta memoria ha tenido como objetivo global, diseccionar las consecuencias funcionales que provoca la alteración de una ruta de MAPKs en un patógeno fúngico, la levadura *Candida albicans*, sobre la respuesta inmune innata desencadenada en el huésped, en particular sobre las respuestas mediadas por el receptor humano Dectin-1.

***Candida albicans* como modelo de investigación de la infección fúngica.**

Candida albicans es un microorganismo comensal, capaz de colonizar las mucosas humanas. Normalmente, esto no conlleva el desarrollo de una infección, ya que la invasión del hongo se ve limitada por la barrera epitelial y por la respuesta inmune local generada, que limita el crecimiento fúngico, estableciendo un estado de tolerancia (Ferwerda et al.). Sólo cuando dicha respuesta local es insuficiente (como por ejemplo en estados de inmunodepresión, o en individuos portadores del polimorfismo para Dectin-1 descrito en la Introducción), el crecimiento fúngico da lugar a una candidiasis mucocutánea. Del mismo modo, cuando la barrera epitelial se ve dañada por mecanismos quirúrgicos o catéteres, la respuesta inmune local es crucial para la contención del hongo, evitando su diseminación por el torrente sanguíneo (candidemia),

lo que podría dar lugar a una candidiasis sistémica, si el hongo no pudiese ser eliminado.

En la actualidad, *Candida albicans* es el patógeno fúngico más común causante de las infecciones nosocomiales, y continúa siendo uno de los mayores retos diagnósticos y terapéuticos de la medicina hoy en día (Ruhnke, 2006). Además, puesto que este patógeno es un comensal habitual de la microbiota humana, la identificación de nuevas dianas terapéuticas encaminadas a mejorar la respuesta protectora del huésped frente a la candidiasis, supone un auténtico desafío para la lucha contra las infecciones fúngicas. Debido a que el desenmascaramiento del β -glucano provoca un aumento del reconocimiento de este patógeno por parte del sistema inmune (Gow et al., 2007; Wheeler and Fink, 2006), la identificación de genes implicados en este proceso ha atraído el interés de numerosas investigaciones encaminadas al desarrollo de nuevas terapias antifúngicas. Dectin-1 ha sido implicado desde hace tiempo en la defensa inmune frente a *Candida albicans* y, aunque existen numerosas publicaciones acerca de la interacción entre ambos y de las consecuencias de la misma, el uso de modelos en ratón, así como el uso de ligandos aislados del receptor, han dado como resultado un vago conocimiento sobre la interacción real que se establece entre el huésped (humano) y el patógeno (hongo), y sobre los mecanismos que gobiernan el delicado equilibrio que permite pasar del comensalismo a la patogenia. A lo largo de esta Tesis se ha demostrado como una ruta de señalización de MAPK está implicada en el enmascaramiento del β -glucano en un hongo patogénico, determinando por tanto el tipo de respuesta inmune puesta en marcha frente al mismo. Este trabajo de investigación presenta evidencias que demuestran que la alteración de la ruta de MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*, induce una mayor exposición de β -glucano en su pared celular, haciendo al patógeno más “visible” frente al receptor de reconocimiento de patrones Dectin-1. Este desenmascaramiento del hongo, da lugar a la activación de diversas respuestas inmunes innatas desencadenadas por Dectin-1 en fagocitos mononucleares humanos (células dendríticas y macrófagos). Consecuentemente, el desarrollo de nuevas drogas específicas para esta ruta de MAPK del hongo, podría generar nuevas herramientas para la lucha frente a las infecciones fúngicas, estableciendo las bases para el desarrollo de nuevas estrategias contra *Candida*.

La ruta MAPK mediada por *CEK1* como mecanismo de enmascaramiento del β -glucano: consecuencias funcionales de su alteración sobre la respuesta inmune.

El estudio aquí presentado muestra como la exposición de β -glucano en la pared celular de los mutantes de delección *cek1* y *hst7* ocurre a lo largo de toda la superficie celular, al contrario de lo que sucede en la cepa silvestre CAF2, donde la exposición del β -glucano está restringida a pequeños zonas aisladas, localizadas en las regiones septales que aparecen entre las blastoesporas madre e hija, así como en las cicatrices de gemación. El desenmascaramiento del β -glucano induce un aumento en el reconocimiento del patógeno mediado por Dectin-1. Esto se traduce también en un aumento en la captación, la fagocitosis y la eliminación del patógeno, así como en la activación de rutas de señalización intracelular en las células fagocíticas encargadas de dicha eliminación. En cuanto a este último punto, en el presente trabajo se muestra como la activación de las quinasas Syk, Raf-1 y ERK, así como la degradación de I- κ B se ven aumentadas en células dendríticas humanas expuestas al mutante *cek1*, al igual que ocurre con la activación de AP-1 dependiente de Dectin-1 en transfectantes transitorios de este receptor. Como consecuencia de la activación de estas rutas de señalización, se detectó también un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como en la secreción de citoquinas (concretamente de TNF α e IL-10).

Todos estos datos sugieren que esta respuesta inmune exacerbada, mediada por Dectin-1, podría explicar al menos en parte, la virulencia atenuada mostrada por los mutantes *cek1* en modelos animales de candidiasis sistémica o localizada (Csank et al., 1998; Guhad et al., 1998). Por otro lado, ya se había descrito previamente que en determinadas condiciones, la MAPK *Cek1* participa en filamentación e invasión (Leberer et al., 1996). Además, esta ruta también se ha visto envuelta en la biogénesis de la pared celular, dado que tanto los mutantes *cek1*, como otros mutantes defectivos en su fosforilación (*hst7* o *sho1*), son sensibles a compuestos como el rojo Congo, el blanco de calcoflúor, la caspofungina o a las zimoliasas (Eisman et al., 2006; Roman et al., 2009; Roman et al., 2005). Podría por tanto plantearse la hipótesis de que la hipersensibilidad a los agentes que alteran la pared celular, así como la exposición incrementada de β -glucano mostradas por el mutante *cek1*, reflejan una organización alterada de la pared celular que podría provocar una menor resistencia a los mecanismos

de eliminación del hongo. De acuerdo con esta hipótesis, los resultados aquí presentados muestran que estos mutantes son más susceptibles a la captación, así como a la eliminación mediadas por las hDCs. Es más, el índice fagocítico se reduce notablemente en presencia del mAb anti-Dectin-1 humano (MGD3), lo que sugiere un papel esencial de este PRR en la captación del mutante *cek1* por parte de las hDCs. Una importante consideración a tener en cuenta es que, a pesar de que el índice fagocítico de los hMΦs para el mutante *cek1* era el doble que para la cepa silvestre, la susceptibilidad de ambas cepas a la eliminación llevada a cabo por los hMΦs era muy similar. Una posible explicación a este hecho es que los macrófagos humanos usados, derivaban de monocitos obtenidos a partir de células de sangre periférica, es decir, estos macrófagos no habían sido previamente inducidos o activados y por tanto sus funciones citocidas podrían estar sólo parcialmente activadas. Además, el bloqueo con el mAb MGD3 de la fagocitosis mediada por los hMΦs es menos significativo que el de las hDCs, lo que podría explicarse porque, a pesar de que Dectin-1 es un receptor fagocítico, su nivel de expresión en la superficie de los hMΦs primarios parece ser menor comparada con la de las hDCs (ver Figura 1 en el Anexo 1). Esta menor expresión en superficie, junto con la función citocida atenuada mostrada por los hMΦs, podrían no ser suficientes para iniciar los mecanismos específicos de eliminación del hongo que en cambio sí están siendo activados en las hDCs. Por otra parte, los MΦs expresan mayores niveles de TLRs que las DCs (Netea et al., 2008) lo que podría enmascarar la eliminación específica de *cek1* mediada por Dectin-1. Por tanto, el patrón de PRRs expresados por cada uno de estos tipos celulares (hDCs o hMΦs), así como el lugar en el que se encuentran, serán los que finalmente determinen el tipo de respuesta generada tras el reconocimiento de *C. albicans*. No obstante, es necesario profundizar en el estudio de la regulación específica de los mecanismos de eliminación del hongo para aclarar en último término este tema.

A lo largo de esta Tesis se propone que la ruta de MAPKs mediada por *CEK1*, es esencial en la respuesta transcripcional que conduce al enmascaramiento del β -glucano, evitando de esta forma la detección mediada por Dectin-1 en el huésped, y proporcionando una explicación a la menor virulencia mostrada por los mutantes *cek1*. Sin embargo, el trabajo aquí presentado se centra en el análisis de las consecuencias funcionales que tiene sobre el sistema inmune, la mayor exposición de β -glucano provocada tras la delección del gen *CEK1*. No obstante, es necesario tener en cuenta que

la eliminación de dicho gen, podría dar lugar a fenotipos adicionales que no pueden ser excluidos como posibles causas de los defectos en virulencia mostrados por el mutante *cek1* en modelos de infección sistémica o localizada (Csank et al., 1998; Guhad et al., 1998).

El control de la infección fúngica.

Aunque la visión clásica del control de las infecciones fúngicas señala a la respuesta T_H1 como la principal responsable, diversos estudios han demostrado que las T_{reg} s y la T_H17 juegan también un papel determinante. Sin embargo, muchos de estos estudios son contradictorios, probablemente debido a diferencias en el tipo de cepa de hongo, la dosis usada del mismo y el fondo genético del ratón infectado. Seguramente exista un delicado equilibrio entre las respuestas T_H1 y T_H17 de manera que en los momentos iniciales, sea la T_H17 la decisiva para permitir el reclutamiento de neutrófilos que controlen la infección, mientras que posteriormente, la secreción de interferón gamma (IFN- γ) por parte de las células T_H1 sea la que determine la activación de dichos neutrófilos y de otros fagocitos para la eliminación del patógeno. Por su parte, las T_{reg} s actuarían controlando la inflamación y contribuyendo al desarrollo de la memoria inmunitaria (Goodridge et al., 2009b). De acuerdo con esta teoría, se ha comprobado que la activación de TLR2 en respuesta a hongos o a zymosan promueve preferencialmente la generación de T_{reg} s, que a su vez es contrarestanda por la activación de Dectin-1 (Osorio et al., 2008). El efecto inmunosupresor inducido por TLR2, podría ser aprovechado por el hongo para activar de forma prematura los efectos antiinflamatorios, necesarios durante la fase de recuperación de la infección, y que permiten revertir la inflamación. Es decir, que la activación inapropiada o prematura de TLR2 puede ser usada por los hongos como un mecanismo de escape (Netea et al., 2008). Esta hipótesis está avalada por diversos estudios con el ratón deficiente en TLR2 (TLR2^{-/-}) que muestra menor mortalidad tras la infección por *C. albicans*, así como una reducción en la carga fúngica y en la secreción de IL-10, mientras que la producción de IL-12 e IFN- γ se ven aumentadas (Bellocchio et al., 2004; Netea et al., 2004). El análisis de los datos aquí mostrados permite especular con la posibilidad de que los ratones deficientes en Dectin-1 (Dectin-1^{-/-}) pudiesen ser más susceptibles que los ratones silvestres a la infección con cepas carentes de la MAPK *Cek1*. Sin embargo, el

resultado final de las infecciones experimentales se ve influenciado por muchos otros mecanismos, incluyendo el reconocimiento por los distintos PRRs, así como la producción de citoquinas y otros factores como la adherencia a las células del huésped, el método de infección, o las tasas de crecimiento de los mutantes utilizados. Por tanto, sería necesario llevar a cabo más estudios *in vivo* que evaluaran la relevancia del desenmascaramiento del β -glucano durante la respuesta inmune. En relación con este último punto, el estudio llevado a cabo por Wheeler *et al.* (Wheeler et al., 2008) pone de manifiesto que el β -glucano se desenmascara de forma progresiva durante la infección, confirmando por tanto el papel crucial de Dectin-1 en la respuesta antifúngica protectora.

La señalización intracelular mediada por Dectin-1 en respuesta a *C. albicans*.

El reconocimiento por parte de Dectin-1 del zymosan (extracto rico en β -glucano obtenido a partir de la pared celular de *S. cerevisiae*) en las DCs, dispara la activación de las quinasas Syk y ERK (Dillon et al., 2006; Rogers et al., 2005). En referencia a la fosforilación de Syk, los datos de este trabajo muestran que en hDCs, esta quinasa no es activada (o al menos su activación no es detectable) en respuesta a la cepa silvestre, pero que tras la estimulación de las hDCs con el mutante *cek1*, sí existe una fosforilación de dicha quinasa. Además, la fosforilación de ERK inducida por el mutante *cek1* era más prolongada en el tiempo en comparación con la promovida por la cepa silvestre. Estos datos coinciden con observaciones previas que mostraban que la fosforilación de ERK estaba acoplada a la ruta de señalización Dectin-1/Syk (Meyer-Wentrup et al., 2005; Slack et al., 2007). El estudio aquí presentado muestra también que el mutante *cek1* induce la señalización vía Raf-1 (Gringhuis et al., 2009) de forma más eficiente de lo que lo hace la cepa silvestre CAF2. Sin embargo, a pesar de que la activación de Syk sólo se induce a través de Dectin-1, la activación de Raf-1 se induce tanto a través de Dectin-1, como a través de DC-SIGN (Gringhuis et al., 2007), lo que explicaría el nivel basal de activación de las hDCs expuestas a las levaduras de la cepa silvestre CAF2. Finalmente y de acuerdo con varios estudios previos que han demostrado que Dectin-1 activa NF- κ B (Gantner et al., 2003; Gross et al., 2006) así como AP-1 (Toyotome et al., 2008) a través de Syk, este estudio muestra

indirectamente (a través del estudio de la degradación de I- κ B- α en hDCs) que tan sólo la cepa mutante *cek1* es capaz inducir la activación de NF- κ B, y que este mutante induce una mayor activación de AP-1 (comparada con la cepa silvestre) dependiente de Dectin-1, en transfectantes estables para dicho receptor. Es decir que en su conjunto, los datos presentados junto con las evidencias previas, permiten sugerir que la mayor exposición de β -glucano en la pared celular del mutante *cek1* induce un mayor reconocimiento por parte de Dectin-1, lo que da lugar a la fosforilación de Syk/ERK/Raf-1, que a su vez activa NF- κ B y AP-1, induciendo finalmente a la producción de ROS y a la síntesis de citoquinas. A este respecto, el mutante *cek1* induce una ligera pero significativamente mayor secreción de TNF α que la inducida por CAF2 en las hDCs, así como una mayor producción de IL-10 que podría ser beneficiosa para resolver el proceso inflamatorio en estadios más tardíos de la infección (Dillon et al., 2006; Romani, 2004). La débil secreción de citoquinas inducida por la cepa silvestre de *C. albicans* podría prevenir el reclutamiento de las células efectoras y por tanto la eliminación del patógeno, explicando en ultimo término la persistencia del mismo como comensal. Sin embargo, la relevancia biológica del ligero aumento en la síntesis de citoquinas inducida por la cepa mutante *cek1* no está muy clara y este tenue incremento podría no ser responsable por sí mismo de la pérdida de virulencia, mientras que el aumento de la fagocitosis así como de los mecanismos de eliminación observados en las hDCs, sí podrían colaborar en la transición desde el comensalismo a la infección.

El enmascaramiento del β -glucano como mecanismo de evasión del sistema inmune.

Durante la infección por *C. albicans*, es posible encontrar en los tejidos infectados tanto la forma de unicelular o levaduriforme, como formas filamentosas. Las DCs son capaces de discriminar ambas morfologías, poniendo en marcha respuestas protectoras contra las blastoesporas y tolerogénicas frente a las hifas, a través de la activación de distintos PRRs (d'Ostiani et al., 2000). Gantner *et al.* (Gantner et al., 2005) demostraron que el β -glucano sólo es detectado en la forma unicelular, exponiéndose únicamente en las cicatrices de gemación surgidas debido a la alteración de la pared durante el proceso de gemación. Aunque en estado de hifa el hongo es capaz de crecer, las células hijas no se separan entre ellas por lo que no se forman cicatrices

que dejen entrever el β -glucano y por tanto en este estado, Dectin-1 no es capaz de reconocer al patógeno. Recientemente, Wheeler *et al.* detectaban la exposición de β -glucano en filamentos de *C. albicans* obtenidos a partir de riñones de ratones infectados (Wheeler et al., 2008). Sin embargo, no está claro si esta reorganización estructural de la pared celular está deliberadamente controlada por el hongo, o si es más bien una consecuencia de la exposición a los diversos factores participantes en la respuesta inmune del huésped. Lo curioso es que este mismo grupo demostró anteriormente que, tanto el tratamiento de *C. albicans in vitro* con caspofungina, como la administración en dosis subinhibitorias *in vivo* de dicha droga, alteraban la pared celular del hongo, provocando una mayor exposición de β -glucano y desenmascarando los filamentos (Wheeler and Fink, 2006). Es más, los mismos autores usaron en este mismo trabajo un anticuerpo anti- β -glucano para rastrear una librería del genoma de *S. Cerevisiae*, con el fin de identificar genes implicados en el enmascaramiento del β -glucano. De los 79 mutantes que mostraron mayor exposición de β -glucano, 68, (el 86%), también se unieron más eficientemente a una forma soluble de Dectin-1 (Wheeler and Fink, 2006). Es decir, que a pesar de la controversia en torno a la exposición de β -glucano en los filamentos de *C. albicans*, creada por los trabajos de Wheeler *et al.* (Wheeler and Fink, 2006; Wheeler et al., 2008) o el de Torosantucci *et al.* (Torosantucci et al., 2005) que también detectaba β -glucano en hifas, el cambio morfogénico de espora a hifa en *C. albicans* está ampliamente aceptado como mecanismo de evasión del sistema inmune. Además, esta hipótesis está fuertemente avalada por numerosos trabajos que demuestran que la exposición de β -glucano, inducida por el tratamiento con drogas como la caspofungina, por el aniquilamiento de la espora por calor o por la mutación de genes de glicosilación que provocan alteraciones en la capa de mananos, dan lugar a una respuesta inflamatoria exacerbada mediada por Dectin-1, sugiriendo que la capa de manoproteínas debe estar enmascarando el β -glucano e impidiendo que este sea reconocido por dicho PRR.

El delicado equilibrio existente entre protección e infección, depende a su vez de un complejo balance molecular entre los componentes de *C. albicans* que están accesibles en su pared celular y los receptores expuestos en las células inmunes que encuentran al patógeno. Sin embargo, existe un dato aparentemente contradictorio: si los mananos por sí mismos son inmunomoduladores (Gantner et al., 2003; Lillegard et

al., 2006; Mangeney et al., 1989; Netea et al., 2006; Pietrella et al., 2006; Sheng et al., 2006) ¿cómo puede tener a su vez dicho PAMP un papel inhibitor al enmascarar el β -glucano, impidiendo su reconocimiento por Dectin-1?. Probablemente esto dependa de la compleja interacción entre los TLRs y los CLRs. Aunque ambos PAMPs (mananos y glucanos) inducen respuestas proinflamatorias por separado, el efecto sinérgico creado por la activación de los TLRs (por los mananos) y de Dectin-1 (por el β -glucano), amplifica dicha respuesta (Brown et al., 2003). Si el hongo es capaz de evadir el reconocimiento mediado por Dectin-1, el sinergismo se pierde y a pesar de que los mananos son reconocidos, la activación de la respuesta inmune es ineficiente (Netea et al., 2008). Sin embargo, cuando existen múltiples receptores implicados en el reconocimiento de un mismo patógeno, la evasión microbiana se ve reducida y el sistema puede adaptar la respuesta inflamatoria al tipo de microbio encontrado. Es decir, la correcta respuesta inmune frente a *C. albicans* depende principalmente del efecto sinérgico entre los PRRs que la reconocen, más que de la activación individual de las distintas vías de señalización que dichos PRRs activan.

El modelo integrado de reconocimiento de *C. albicans*. Papel de los distintos ligandos de Dectin-1 en la modulación de la respuesta inmune.

Netea *et al.* han propuesto un modelo integrado para el reconocimiento de *C. albicans* por parte del sistema inmune, en el que dicho reconocimiento requiere la colaboración de distintos PRRs para detectar los mananos y los glucanos (Netea et al., 2008). El balance final de la respuesta inmune frente a *C. albicans* dependería por tanto del entramado equilibrio entre las señales generadas a través de TLR2, TLR4, Dectin-1, MR y DC-SIGN (entre otros); cada uno de ellos reconociendo un PAMP diferente (o incluso a veces común) de la pared celular. Tanto TLR2 como TLR4 colaboran con Dectin-1 en la inducción de una respuesta inflamatoria (Brown et al., 2003; Dennehy et al., 2008; Gantner et al., 2003; Netea et al., 2006).

En el trabajo aquí presentado se muestra que la activación específica de Dectin-1 por parte de *C. albicans* ocurre sólo cuando el β -glucano está expuesto, de acuerdo con estudios previos (Gantner et al., 2005; Wheeler and Fink, 2006; Wheeler et al., 2008). Los incrementos en la captación, en la eliminación o aniquilamiento del patógeno, así

como en la síntesis de citoquinas observados en las hDCs expuestas al mutante *cek1*, eran inhibidos por el mAb anti-Dectin-1 MGD3, demostrando una inducción dependiente de Dectin-1. Sin embargo, no se puede excluir la participación de otros PRRs en este proceso (Cambi et al., 2003; Cambi et al., 2008; Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Gringhuis et al., 2007) y es por tanto necesario analizar la compleja red de interconexiones entre Dectin-1 y otros PRRs en la inmunidad frente a *C. albicans*, especialmente en el contexto del reconocimiento *in vivo* de hongos intactos por parte de las células inmunes primarias humanas. A este respecto, aquí se presentan datos observados en respuesta a hongos, bien vivos o bien inactivados con luz UV, que inducen respuestas más débiles que las que provocan los hongos matados por calor, pero que sin embargo, son más parecidas al contexto real que encuentra el huésped en su interacción con el patógeno (Figura 27). Estos datos indican la necesidad de realizar estudios usando células de *C. albicans* vivas o correctamente inactivadas por luz UV (Figura 23) para evitar sacar conclusiones erróneas o engañosas. Es más, el uso de componentes fúngicos aislados o de zymosan podrían no estar reflejando la verdadera complejidad de la respuesta frente a los hongos completos *in vivo*.

Existen numerosos trabajos publicados sobre los efectos biológicos de los β -glucanos, pero muchos de ellos son a menudo contradictorios. Esto es debido principalmente al uso de β -glucanos con distintos pesos moleculares, modificados químicamente o derivados de distintos hongos y levaduras (Tabla 3). De hecho, se ha comprobado que el uso de β -glucanos solubles altamente purificados y con pesos moleculares muy variables, no estimula la secreción de citoquinas mediada por Dectin-1, mientras que otras partículas ricas en β -glucano como el zymosan, el curdlan o el Glu-mp sí son estimuladoras (Brown and Gordon, 2003; Brown et al., 2003; Hernanz-Falcon et al., 2009). En cualquier caso, ni el zymosan, ni ninguno de estos ligandos particulados, representan exactamente el contexto que encuentra Dectin-1 en una infección fúngica, lo que explicaría las distintas respuestas observadas con los diferentes ligandos clásicamente usados. Es posible extraer la conclusión de que, preservar la estructura de la pared celular, es de extraordinaria importancia para elucidar la compleja interacción entre la célula inmune y el hongo.

Nuevos mecanismos de protección frente a *C. albicans*: la ruta MAPK mediada por *CEK1* como posible diana terapéutica y el estado actual de las vacunas antifúngicas.

Muchos de los genes que participan en las rutas mediadas por las MAPKs fúngicas desempeñan actividades bien definidas que están directamente relacionadas con la virulencia. Esto queda patente en la reducción o incluso la pérdida de virulencia mostrada por cepas carentes de algún elemento esencial de estas cascadas en modelos experimentales de infección. Pero además, las MAPKs son también importantes para el desarrollo de una correcta respuesta frente al patógeno en los mamíferos, en los que se han visto implicadas en todos los aspectos de la respuesta inmune, e incluso existen compuestos específicos que las inhiben. Por tanto, podría especularse con la posibilidad de que existan suficientes diferencias funcionales entre las rutas de MAPKs fúngicas y las del huésped, que permitan desarrollar nuevas drogas y estrategias terapéuticas efectivas en un futuro cercano (Roman et al., 2007). Por otra parte, los mecanismos de control del enmascaramiento del β -glucano son excelentes dianas terapéuticas, como ha puesto de relieve la inducción de su exposición con drogas como la caspofungina. En este sentido, el uso de nuevas drogas antifúngicas que aumenten la exposición de este PAMP, podría usarse para facilitar su reconocimiento por anticuerpos anti- β -glucano naturales, detectados en pacientes con infecciones fúngicas sistémicas (Poulain and Jouault, 2004; Torosantucci et al., 2005) e incluso por PRRs como Dectin-1, haciendo al patógeno más vulnerable frente al sistema inmune del huésped. A este respecto, el estudio presentado en esta Tesis demuestra que el incremento de exposición de β -glucano en la pared celular del mutante *cek1* tiene como resultado un aumento de la respuesta inmune innata mediada por Dectin-1, por lo que la ruta de MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*, puede ser propuesta como una valiosa diana terapéutica.

De entre las enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y hongos, estas últimas son las únicas para las que no existe aún ninguna vacuna (Cassone, 2008), lo que puede atribuirse tanto a la complejidad de los patógenos, como a las sofisticadas estrategias que han desarrollado para sobrevivir en el huésped, evadiendo el sistema inmune (Romani, 2004). Puesto que la vacunación es una de las herramientas más potentes para la protección frente a las infecciones microbianas, el desarrollo de vacunas frente a las especies de *Candida* podría ser beneficioso para un amplio grupo de

pacientes inmunodeprimidos. La aplicación de dichas vacunas debería inducir tanto la respuesta celular como la humoral. Un adyuvante eficiente para la vacunación frente a *Candida* debería ser capaz de estimular a los CLR, ya que estos receptores no sólo inducen respuestas inflamatorias, sino que también las modulan, controlando la secreción de citoquinas y estimulando una correcta respuesta protectora, así como una respuesta inmune adaptativa efectiva (Ferwerda et al.). Dado que la activación de Dectin-1 da lugar a una respuesta coordinada de tipo T_{H1} y T_{H17} , podría aprovecharse este efecto protector contra el hongo si se usaran β -glucanos como coadyuvantes. El problema estaría de nuevo en el tipo de β -glucano elegido. Habría que tener en cuenta las diferentes respuestas inducidas por los distintos β -glucanos y mediadas por Dectin-1 a la hora de elegir alguno de ellos como posible coadyuvante. Respecto al uso de componentes fúngicos como adyuvantes en la vacunación, se ha desarrollado una vacuna en ratas usando laminarina (β -(1,3)-glucano obtenido del alga *Laminaria digitata*) junto a un coadyuvante (la toxina de la difteria CRM197) (Torosantucci et al., 2005) y la vacunación con este conjugado resultó ser inmunogénica y protectora contra infecciones sistémicas y vaginales por *C. albicans* y *A. fumigatus*. Probablemente la protección de dicha vacuna sea debida a los anticuerpos anti- β -glucano desarrollados por el huésped, que reconocerían el PAMP de la pared celular, permitiendo su opsonización y facilitando la deposición del complemento, lo que provocaría entonces la asociación preferencial de los hongos circulantes a los fagocitos (Han et al., 2001; Poulain and Jouault, 2004). Recientemente Pietrella *et al.* (Pietrella et al.) han confirmado en ratón la capacidad protectora de esta vacuna y su mecanismo de acción a través de los anticuerpos anti- β -glucano.

Como conclusión final, el trabajo de investigación que ha dado lugar a la Tesis Doctoral aquí presentada, demuestra que la ruta de MAPK mediada por *CEK1* desempeña un papel fundamental en el enmascaramiento del β -glucano de la pared celular de *C. albicans* y que, dado el alto grado de conservación existente entre las rutas de MAPKs fúngicas, este fenómeno podría ser un mecanismo general de los hongos para evadir su detección por el sistema inmune del huésped. Adicionalmente, este estudio pone de manifiesto el valor de las rutas de MAPKs fúngicas como potenciales dianas terapéuticas en la modulación de la respuesta inmune del huésped frente al patógeno.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- I. El aumento específico de la unión de los mutantes de delección en la ruta de MAPK mediada por *CEK1* de *C. albicans*, a transfectantes estables para el receptor humano Dectin-1, sugiere que dicha ruta desempeña un papel crucial en el control de los PAMPs expuestos en la pared celular del hongo.
- II. La alteración de la ruta de MAPK mediada por *CEK1*, provoca un aumento en la exposición de β -glucano en la pared celular de *C. albicans*, que da lugar a un reconocimiento más eficiente por parte de Dectin-1.
- III. La respuesta inmune frente al mutante de delección de la MAPK *Cek1*, se ve incrementada en cuanto a la detección, la fagocitosis y la eliminación del hongo, mediadas por fagocitos humanos (macrófagos y células dendríticas humanas derivadas de monocitos; hM Φ s y hDCs).
- IV. El mutante *cek1* de *C. albicans* activa las rutas de señalización dependientes de Dectin-1, induciendo la fosforilación de las quinasas Syk, ERK y Raf-1, así como la activación del factor de transcripción NF- κ B en hDCs.
- V. La mutación de la MAPK *Cek1* induce la activación dependiente de Dectin-1 del factor de transcripción AP-1, en transfectantes transitorios en la línea celular HEK293T.
- VI. El mutante de delección *cek1* induce una mayor secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respecto de la cepa silvestre, en macrófagos de ratón de la línea celular RAW 264.7.
- VII. Los hM Φ s y las hDCs inducen una mayor respuesta oxidativa dependiente de Dectin-1 en respuesta al mutante de delección *cek1*, en comparación con la cepa silvestre.

- VIII.** Las levaduras deficientes en la MAPK Cek1 inducen un ligero aumento dependiente de Dectin-1, respecto de la cepa silvestre, en la secreción de las citoquinas TNF α e IL-10 mediada por las hDCs.
- IX.** El aumento en la exposición de β -glucano en la pared celular de *C. albicans*, producido como consecuencia de la alteración de la ruta de MAPK mediada por *CEK1*, determina la respuesta inmune generada contra el hongo mediada por Dectin-1.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, Y., Ishii, T., Ikeda, Y., Hoshino, A., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Ohno, N. (2004). Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun* 72, 4159-4171.
- Adams, E.L., Rice, P.J., Graves, B., Ensley, H.E., Yu, H., Brown, G.D., Gordon, S., Monteiro, M.A., Papp-Szabo, E., Lowman, D.W., *et al.* (2008). Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 115-123.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M., and Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181, 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Roman, E., Negredo, A.I., Eisman, B., Nombela, C., and Pla, J. (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2, 351-361.
- Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.
- Arana, D.M., Alonso-Monge, R., Du, C., Calderone, R., and Pla, J. (2007). Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 9, 1647-1659.

- Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., and Pla, J. (2005). The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* 151, 1033-1049.
- Ariizumi, K., Shen, G.L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., 3rd, Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 275, 20157-20167.
- Bates, S., Hughes, H.B., Munro, C.A., Thomas, W.P., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A., Brown, A.J., Odds, F.C., *et al.* (2006). Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281, 90-98.
- Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., and Romani, L. (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 172, 3059-3069.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 76, 8729-8736.
- Braun, B.R., and Johnson, A.D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* 277, 105-109.
- Brown, A.J., and Gow, N.A. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7, 333-338.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6, 33-43.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-37.

- Brown, G.D., and Gordon, S. (2003). Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* *19*, 311-315.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* *197*, 1119-1124.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* *196*, 407-412.
- Brown, J., O'Callaghan, C.A., Marshall, A.S., Gilbert, R.J., Siebold, C., Gordon, S., Brown, G.D., and Jones, E.Y. (2007). Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function. *Protein Sci* *16*, 1042-1052.
- Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* *9*, 327-335.
- Cambi, A., and Figdor, C. (2009). Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Curr Biol* *19*, R375-378.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* *33*, 532-538.
- Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.J., Torensma, R., Williams, D.L., and Figdor, C.G. (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem*.
- Cassone, A. (2008). Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis* *8*, 114-124.
- Cassone, A., Marconi, P., and Bistoni, F. (1987). Cell wall of *Candida albicans* and host response. *Crit Rev Microbiol* *15*, 87-95.

- Cassone, A., Mattia, E., and Boldrini, L. (1978). Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. *J Gen Microbiol* 105, 263-273.
- Chen, J., Lane, S., and Liu, H. (2002). A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46, 1335-1344.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* 66, 2713-2721.
- Czop, J.K., and Kay, J. (1991). Isolation and characterization of beta-glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 173, 1511-1520.
- d'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191, 1661-1674.
- Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2007). The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* 82, 253-258.
- Dennehy, K.M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J.A., Taylor, P.R., Kerrigan, A., Tsoni, S.V., Gordon, S., Meyer-Wentrup, F., *et al.* (2008). Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 38, 500-506.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasprowicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., *et al.* (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928.
- Donini, M., Zenaro, E., Tamassia, N., and Dusi, S. (2007). NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol* 37, 1194-1203.

- Douglas, C.M. (2001). Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* 39 *Suppl* 1, 55-66.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263, 9557-9560.
- Drickamer, K. (1989). Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif. *Biochem Soc Trans* 17, 13-15.
- Drickamer, K. (1993). Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45, 207-232.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* 9, 585-590.
- Drickamer, K., and Fadden, A.J. (2002). Genomic analysis of C-type lectins. *Biochem Soc Symp*, 59-72.
- Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3, 685-702.
- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D., Nombela, C., and Pla, J. (2006). The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 5, 347-358.
- Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T.S., Willment, J.A., van Sriel, A.B., Venselaar, H., Elbers, C.C., Johnson, M.D., Cambi, A., Huysamen, C., *et al.* (2009). Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* 361, 1760-1767.
- Ferwerda, G., Netea, M.G., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Romani, L., and Kullberg, B.J. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. *Vaccine* 28, 614-622.
- Filler, S.G. (2006). *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* 9, 333-339.

- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* *134*, 717-728.
- Forman, H.J., Torres, M., and Fukuto, J. (2002). Redox signaling. *Mol Cell Biochem* *234-235*, 49-62.
- Forsyth, C.B., and Mathews, H.L. (2002). Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect Immun* *70*, 517-527.
- Forsyth, C.B., Plow, E.F., and Zhang, L. (1998). Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *J Immunol* *161*, 6198-6205.
- Fradin, C., Poulain, D., and Jouault, T. (2000). beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* *68*, 4391-4398.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* *7*, 1250-1257.
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G.M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., and Chiao, P.J. (2004). NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* *24*, 7806-7819.
- Fuller, G.L., Williams, J.A., Tomlinson, M.G., Eble, J.A., Hanna, S.L., Pohlmann, S., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Watson, S.P., and Pearce, A.C. (2007). The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem* *282*, 12397-12409.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* *197*, 1107-1117.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* *24*, 1277-1286.

Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*.

Gazzinelli, R.T., Ropert, C., and Campos, M.A. (2004). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 201, 9-25.

Geijtenbeek, T.B., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.

Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22, 33-54.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., *et al.* (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med* 205, 1447-1461.

Gersuk, G.M., Underhill, D.M., Zhu, L., and Marr, K.A. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol* 176, 3717-3724.

Giaimis, J., Lombard, Y., Fonteneau, P., Muller, C.D., Levy, R., Makaya-Kumba, M., Lazdins, J., and Poindron, P. (1993). Both mannose and beta-glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leukoc Biol* 54, 564-571.

Glocker, E.O., Hennigs, A., Nabavi, M., Schaffer, A.A., Woellner, C., Salzer, U., Pfeifer, D., Veelken, H., Warnatz, K., Tahami, F., *et al.* (2009). A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 361, 1727-1735.

Goodridge, H.S., Shimada, T., Wolf, A.J., Hsu, Y.M., Becker, C.A., Lin, X., and Underhill, D.M. (2009a). Differential use of CARD9 by Dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 182, 1146-1154.

- Goodridge, H.S., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2007). Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 178, 3107-3115.
- Goodridge, H.S., Wolf, A.J., and Underhill, D.M. (2009b). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* 230, 38-50.
- Gow, N.A., Netea, M.G., Munro, C.A., Ferwerda, G., Bates, S., Mora-Montes, H.M., Walker, L., Jansen, T., Jacobs, L., Tsoni, V., *et al.* (2007). Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* 196, 1565-1571.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C., and Geijtenbeek, T.B. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* 10, 203-213.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 26, 605-616.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442, 651-656.
- Guhad, F.A., Jensen, H.E., Aalbaek, B., Csank, C., Mohamed, O., Harcus, D., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Hau, J. (1998). Mitogen-activated protein kinase-defective *Candida albicans* is avirulent in a novel model of localized murine candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 166, 135-139.
- Han, Y., Kozel, T.R., Zhang, M.X., MacGill, R.S., Carroll, M.C., and Cutler, J.E. (2001). Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol* 167, 1550-1557.
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S.W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., *et al.* (2007). The adaptor protein CARD9 is essential

for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* 8, 619-629.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Martinez, F.O., Martinez-Pomares, L., Brown, G.D., and Gordon, S. (2008). Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog* 4, e1000218.

Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Rosas, M., Willment, J.A., Williams, D.L., Gordon, S., and Brown, G.D. (2006). Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. *J Immunol* 176, 5513-5518.

Hernanz-Falcon, P., Arce, I., Roda-Navarro, P., and Fernandez-Ruiz, E. (2001). Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. *Immunogenetics* 53, 288-295.

Hernanz-Falcon, P., Joffre, O., Williams, D.L., and Reis, E.S.C. (2009). Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. *Eur J Immunol* 39, 507-513.

Herre, J., Marshall, A.S., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038-4045.

Hohl, T.M., Feldmesser, M., Perlin, D.S., and Pamer, E.G. (2008). Caspofungin modulates inflammatory responses to *Aspergillus fumigatus* through stage-specific effects on fungal beta-glucan exposure. *J Infect Dis* 198, 176-185.

Hohl, T.M., Van Epps, H.L., Rivera, A., Morgan, L.A., Chen, P.L., Feldmesser, M., and Pamer, E.G. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog* 1, e30.

Holland, S.M., and Vinh, D.C. (2009). Yeast infections--human genetics on the rise. *N Engl J Med* 361, 1798-1801.

- Hoyer, L.L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 176-180.
- Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., and Akira, S. (2008). Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3, 352-363.
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13, 11-16.
- Janusz, M.J., Austen, K.F., and Czop, J.K. (1986). Isolation of soluble yeast beta-glucans that inhibit human monocyte phagocytosis mediated by beta-glucan receptors. *J Immunol* 137, 3270-3276.
- Janusz, M.J., Austen, K.F., and Czop, J.K. (1988). Phagocytosis of heat-killed blastospores of *Candida albicans* by human monocyte beta-glucan receptors. *Immunology* 65, 181-185.
- Jimenez, D., Roda-Navarro, P., Springer, T.A., and Casasnovas, J.M. (2005). Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of intercellular adhesion molecules (ICAMs). *J Biol Chem* 280, 5854-5861.
- Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.A., Chamaillard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006). Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* 177, 4679-4687.
- Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1983). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem* 94, 937-947.
- Kennedy, A.D., Willment, J.A., Dorward, D.W., Williams, D.L., Brown, G.D., and DeLeo, F.R. (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* 37, 467-478.

- Kobayashi, S.D., and Cutler, J.E. (1998). *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol* 6, 92-94.
- Kohatsu, L., Hsu, D.K., Jegalian, A.G., Liu, F.T., and Baum, L.G. (2006). Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 177, 4718-4726.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kozel, T.R. (1996). Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 9, 34-46.
- Kumamoto, C.A., and Vices, M.D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7, 1546-1554.
- Lamaris, G.A., Lewis, R.E., Chamilos, G., May, G.S., Safdar, A., Walsh, T.J., Raad, II, and Kontoyiannis, D.P. (2008). Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J Infect Dis* 198, 186-192.
- Leberer, E., Hargus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J., and Thomas, D.Y. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13217-13222.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Hargus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L., and Thomas, D.Y. (1997). Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* 7, 539-546.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., *et al.* (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8, 630-638.

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lillegard, J.B., Sim, R.B., Thorkildson, P., Gates, M.A., and Kozel, T.R. (2006). Recognition of *Candida albicans* by mannan-binding lectin in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 193, 1589-1597.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2000). Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2, 279-288.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Mangeney, M., Fischer, A., Le Deist, F., Latge, J.P., and Durandy, A. (1989). Direct activation of human B lymphocytes by *Candida albicans*-derived mannan antigen. *Cell Immunol* 122, 329-337.
- McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* 41, 1109-1121.
- McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Taylor, P.R. (2006). The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* 16, 422-430.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (2005). "Sweet talk": closing in on C type lectin signaling. *Immunity* 22, 399-400.
- Meyer-Wentrup, F., Figdor, C.G., Ansems, M., Brossart, P., Wright, M.D., Adema, G.J., and van Spriel, A.B. (2007). Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *J Immunol* 178, 154-162.

- Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C., and Pla, J. (2006). The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* *152*, 905-912.
- Moreno-Ruiz, E., Galan-Diez, M., Zhu, W., Fernandez-Ruiz, E., d'Enfert, C., Filler, S.G., Cossart, P., and Veiga, E. (2009). *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol* *11*, 1179-1189.
- Nakamura, K., Miyazato, A., Koguchi, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Saijo, S., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Fujita, J., *et al.* (2008). Toll-like receptor 2 (TLR2) and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffei*. *Microbes Infect* *10*, 1223-1227.
- Navarro-Garcia, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R., and Nombela, C. (1998). A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* *144* (Pt 2), 411-424.
- Navarro-Garcia, F., Eisman, B., Fiuza, S.M., Nombela, C., and Pla, J. (2005). The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* *151*, 2737-2749.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J., and Nombela, C. (1995). Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* *15*, 2197-2206.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* *6*, 67-78.
- Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* *116*, 1642-1650.
- Netea, M.G., Suttmoller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C.A., Van der Meer, J.W., van Krieken, J.H., Hartung, T., Adema, G., and Kullberg, B.J. (2004). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* *172*, 3712-3718.

- Odds, F.C. (1987). Candida infections: an overview. *Crit Rev Microbiol* 15, 1-5.
- Odds, F.C., Van Gerven, F., Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M.S., Ghannoum, M.A., Lancaster, M.V., Pfaller, M.A., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., and Walsh, T.J. (1998). Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 282-288.
- Olsson, S., and Sundler, R. (2007). The macrophage beta-glucan receptor mediates arachidonate release induced by zymosan: essential role for Src family kinases. *Mol Immunol* 44, 1509-1515.
- Osorio, F., LeibundGut-Landmann, S., Lochner, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Eberl, G., and Reis e Sousa, C. (2008). DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* 38, 3274-3281.
- Palma, A.S., Feizi, T., Zhang, Y., Stoll, M.S., Lawson, A.M., Diaz-Rodriguez, E., Campanero-Rhodes, M.A., Costa, J., Gordon, S., Brown, G.D., *et al.* (2006). Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem* 281, 5771-5779.
- Pietrella, D., Bistoni, G., Corbucci, C., Perito, S., and Vecchiarelli, A. (2006). Candida albicans mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol* 8, 602-612.
- Pietrella, D., Rachini, A., Torosantucci, A., Chiani, P., Brown, A.J., Bistoni, F., Costantino, P., Mosci, P., d'Enfert, C., Rappuoli, R., *et al.* (2010). A beta-glucan-conjugate vaccine and anti-beta-glucan antibodies are effective against murine vaginal candidiasis as assessed by a novel in vivo imaging technique. *Vaccine* 28, 1717-1725.
- Plantinga, T.S., Fransen, J., Takahashi, N., Stienstra, R., van Riel, P.L., van den Berg, W.B., Netea, M.G., and Joosten, L.A. (2010). Functional consequences of DECTIN-1 early stop codon polymorphism Y238X in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R26.

- Plantinga, T.S., van der Velden, W.J., Ferwerda, B., van Spriël, A.B., Adema, G., Feuth, T., Donnelly, J.P., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Blijlevens, N.M., *et al.* (2009). Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 49, 724-732.
- Poulain, D., and Jouault, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* 7, 342-349.
- Quesniaux, V., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yermeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., *et al.* (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6, 946-959.
- Rappleye, C.A., Eissenberg, L.G., and Goldman, W.E. (2007). *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1366-1370.
- Reid, D.M., Gow, N.A., and Brown, G.D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., *et al.* (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22, 507-517.
- Roman, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., and Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* 15, 181-190.
- Roman, E., Cottier, F., Ernst, J.F., and Pla, J. (2009). The Msb2 signaling mucin controls the activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*.
- Roman, E., Nombela, C., and Pla, J. (2005). The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 25, 10611-10627.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 4, 1-23.

- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 10, 508-514.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., Verbeek, S., Calderone, R.A., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* 16, 149-161.
- Rosas, M., Liddiard, K., Kimberg, M., Faro-Trindade, I., McDonald, J.U., Williams, D.L., Brown, G.D., and Taylor, P.R. (2008). The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol* 181, 3549-3557.
- Rothfuchs, A.G., Bafica, A., Feng, C.G., Egen, J.G., Williams, D.L., Brown, G.D., and Sher, A. (2007). Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol* 179, 3463-3471.
- Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7, 495-504.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8, 39-46.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.
- Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D., Jr., and Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 281, 38854-38866.

- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2, 1053-1060.
- Serrano-Gomez, D., Martinez-Nunez, R.T., Sierra-Filardi, E., Izquierdo, N., Colmenares, M., Pla, J., Rivas, L., Martinez-Picado, J., Jimenez-Barbero, J., Alonso-Lebrero, J.L., *et al.* (2007). AM3 modulates dendritic cell pathogen recognition capabilities by targeting DC-SIGN. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2313-2323.
- Shah, V.B., Huang, Y., Keshwara, R., Ozment-Skelton, T., Williams, D.L., and Keshvara, L. (2008). Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner. *J Immunol* 180, 2777-2785.
- Sheng, K.C., Pouniotis, D.S., Wright, M.D., Tang, C.K., Lazoura, E., Pietersz, G.A., and Apostolopoulos, V. (2006). Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* 118, 372-383.
- Shin, D.M., Yang, C.S., Yuk, J.M., Lee, J.Y., Kim, K.H., Shin, S.J., Takahara, K., Lee, S.J., and Jo, E.K. (2008). Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* 10, 1608-1621.
- Slack, E.C., Robinson, M.J., Hernanz-Falcon, P., Brown, G.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V.L., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* 37, 1600-1612.
- Sohn, K., Schwenk, J., Urban, C., Lechner, J., Schweikert, M., and Rupp, S. (2006). Getting in touch with *Candida albicans*: the cell wall of a fungal pathogen. *Curr Drug Targets* 7, 505-512.
- Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J., and Schlesinger, P.H. (1978). Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1399-1403.
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A.G., Zheng, M., Brown, G.D., Gordon, S., Shellito, J.E., and Kolls, J.K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of

- Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med* 198, 1677-1688.
- Steele, C., Rapaka, R.R., Metz, A., Pop, S.M., Williams, D.L., Gordon, S., Kolls, J.K., and Brown, G.D. (2005a). The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 1, e42.
- Steele, C., Shellito, J.E., and Kolls, J.K. (2005b). Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*. *Med Mycol* 43, 1-19.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.
- Tachado, S.D., Zhang, J., Zhu, J., Patel, N., Cushion, M., and Koziel, H. (2007). *Pneumocystis*-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *J Leukoc Biol* 81, 205-211.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., and Gordon, S. (2004). The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* 172, 1157-1162.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169, 3876-3882.
- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 8, 31-38.
- Tkacz, J.S., Cybulska, E.B., and Lampen, J.O. (1971). Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *J Bacteriol* 105, 1-5.

Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Costantino, P., *et al.* (2005). A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 202, 597-606.

Torosantucci, A., Romagnoli, G., Chiani, P., Stringaro, A., Crateri, P., Mariotti, S., Teloni, R., Arancia, G., Cassone, A., and Nisini, R. (2004). *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect Immun* 72, 833-843.

Toyotome, T., Adachi, Y., Watanabe, A., Ochiai, E., Ohno, N., and Kamei, K. (2008). Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages. *Microb Pathog* 44, 141-150.

Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Blanot, D., Nahori, M.A., Werts, C., and Boneca, I.G. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5, 1000-1006.

Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2007). The many faces of ITAMs. *Trends Immunol* 28, 66-73.

Underhill, D.M., Rossnagle, E., Lowell, C.A., and Simmons, R.M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106, 2543-2550.

van der Graaf, C.A., Netea, M.G., Verschueren, I., van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2005). Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 73, 7458-7464.

Viriyakosol, S., Fierer, J., Brown, G.D., and Kirkland, T.N. (2005). Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* 73, 1553-1560.

Weck, M.M., Appel, S., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A., Grunebach, F., and Brossart, P. (2008). hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. *Blood* 111, 4264-4272.

Weis, W.I., Taylor, M.E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163, 19-34.

Wheeler, R.T., and Fink, G.R. (2006). A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* 2, e35.

Wheeler, R.T., Kombe, D., Agarwala, S.D., and Fink, G.R. (2008). Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog* 4, e1000227.

Whiteway, M. (2000). Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 3, 582-588.

Whiteway, M., Dignard, D., and Thomas, D.Y. (1992). Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9410-9414.

Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7, 350-357.

Willment, J.A., Gordon, S., and Brown, G.D. (2001). Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 276, 43818-43823.

Willment, J.A., Lin, H.H., Reid, D.M., Taylor, P.R., Williams, D.L., Wong, S.Y., Gordon, S., and Brown, G.D. (2003). Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 171, 4569-4573.

Willment, J.A., Marshall, A.S., Reid, D.M., Williams, D.L., Wong, S.Y., Gordon, S., and Brown, G.D. (2005). The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* 35, 1539-1547.

Xie, J., Sun, M., Guo, L., Liu, W., Jiang, J., Chen, X., Zhou, L., and Gu, J. (2006). Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 1067-1073.

Yadav, M., and Schorey, J.S. (2006). The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 108, 3168-3175.

Yoneyama, M., and Fujita, T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282, 15315-15318.

Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G.D., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., *et al.* (2005). A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 201, 949-960.

Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 272, 6179-6217.

ANEXOS

ANEXO 1

CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-DECTIN-1 HUMANO MGD3

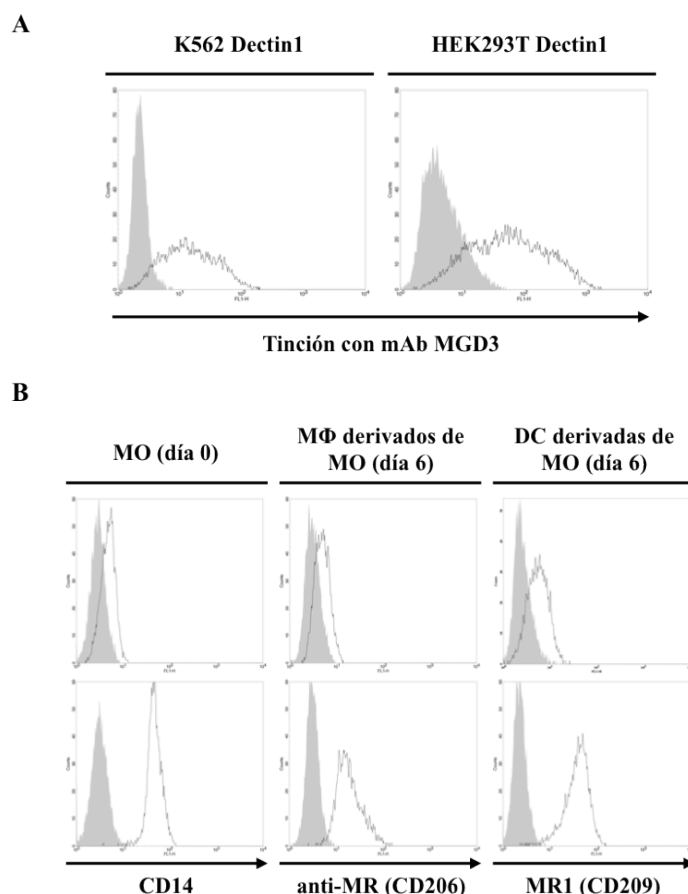


Figura 1. Caracterización de la especificidad del mAb MGD3 en el reconocimiento de la proteína Dectin-1 humana en transfectantes para dicha proteína y en células primarias humanas, mediante citometría de flujo. La imagen muestra los perfiles de citometría de flujo representativos de los niveles de expresión de Dectin-1 tras la tinción con el mAb MGD3. En A se muestran dichos perfiles para células del transfectante estable en K562 o del transfectante transitorio en HEK293T de Dectin-1 (K562 Dectin1 y HEK293T Dectin1, respectivamente). En B se muestran: en la parte superior los niveles de expresión de Dectin-1 en monocitos (MO), así como en macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos (hMΦ y hDC); y en la parte inferior los perfiles de marcadores de superficie característicos para cada tipo celular. Los histogramas grises rellenos corresponden al anticuerpo control y los histogramas negros superpuestos representa la tinción con los mAb MGD3, CD14, anti-MR o MR1 indicados en cada caso.

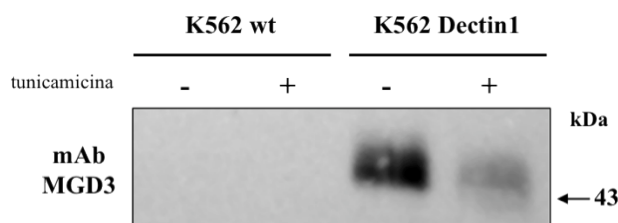


Figura 2. Caracterización de la especificidad del mAb MGD3 en el reconocimiento de la proteína Dectin-1 humana mediante Western Blot. Análisis de Western Blot de los niveles de expresión de la proteína Dectin-1 en células K562 silvestres (K562 wt) o que expresan establemente la proteína (K562 Dectin1). Se muestran los lisados celulares (30 μ g de proteína) de células tratadas o no con tunicamicina (3 μ M, 16 h.) para inhibir la glicosilación. El mAb MGD3 reconoce específicamente la proteína Dectin-1 en los lisados correspondientes a las células K562 Dectin1. La banda reconocida por el MGD3 en los lisados de las células tratadas con tunicamicina muestra un peso molecular aparentemente menor de Dectin-1.

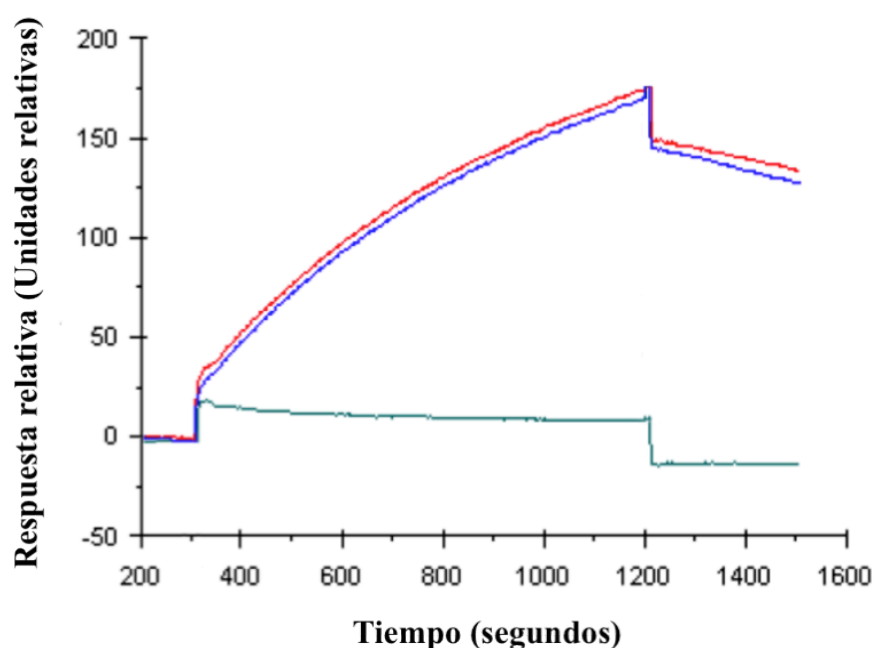


Figura 3. Caracterización de la afinidad por el ligando del mAb MGD3 mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Análisis de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) de la interacción entre el mAb MGD3 y la proteína Dectin-1 humana recombinante. Se muestran los sensogramas representativos obtenidos con el mAb MGD3 inmovilizado sobre la celda de flujo, tras la inyección, bien de medio de cultivo condicionado de células HEK293T transfectadas transitoriamente (con un plásmido control [verde] o con el plásmido portador del cDNA codificante para el dominio extracelular de Dectin-1 [azul]), o bien de la proteínas soluble sDectinFc (rojo). Se muestran las señales obtenidas (unidades relativas) tras sustraer la señal correspondiente detectada usando un anticuerpo control negativo inmovilizado sobre la celda.

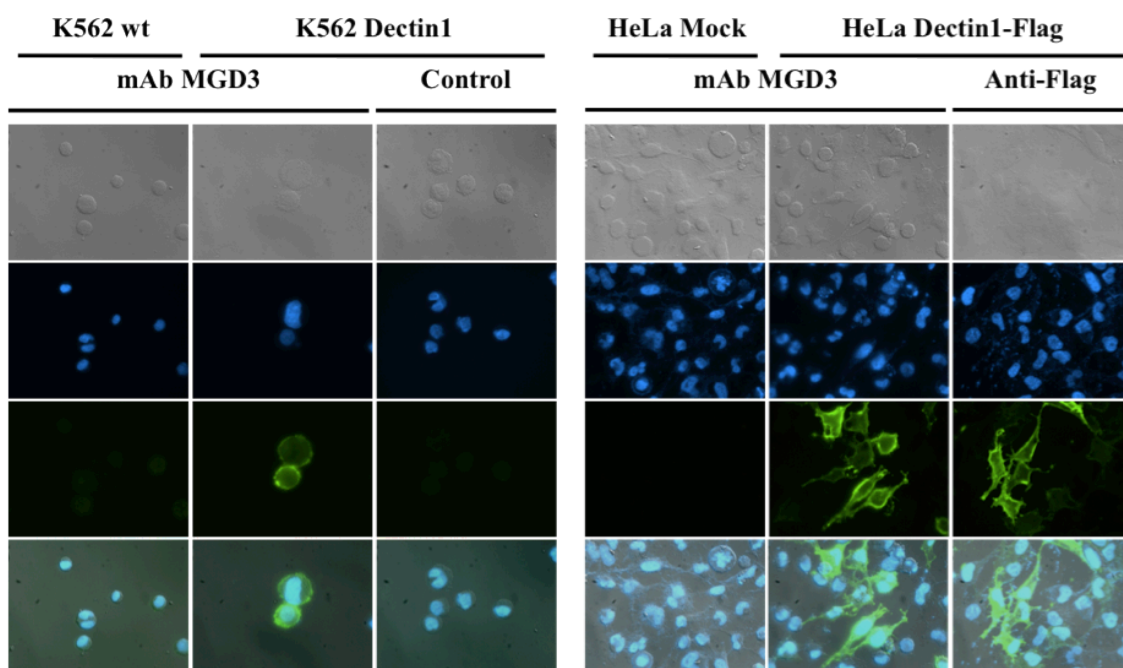


Figura 4. Caracterización de la especificidad del mAb MGD3 en el reconocimiento de la proteína Dectin-1 humana mediante inmunofluorescencia. Análisis de inmunofluorescencia en el que se muestra, a la izquierda, células K562 silvestres *versus* transfectantes estables para Dectin-1 (K562 Dectin-1), y a la derecha, células HeLa transfectadas transitoriamente con un vector vacío (HeLa Mock) o con un plásmido Dectin-1-Flag (HeLa Dectin1-Flag). La tinción con el mAb MGD3 es comparada con un mAb control del mismo isotipo (IgG2a) en el caso de las células K562 y con el mAb anti-Flag (Sigma-Aldrich) en el caso de las células HeLa. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran, de arriba hacia abajo, imágenes de DIC o Nomarski, tinción nuclear con DAPI, tinción con mAb MGD3/isotipo IgG2a/mAb anti-Flag seguido de un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa488 y la fila inferior muestra todos los canales superpuestos.

Las características del mAb MGD3 aquí descritas, junto con los datos mostrados a lo largo de esta Tesis doctoral, confieren al anticuerpo mAb MGD3 una serie de ventajas respecto a otros anticuerpos anti-Dectin-1 humano. Dichas características han permitido solicitar una patente para sus posibles usos y aplicaciones. La patente se refiere al hibridoma clonado (MGD3) (depositado en la colección de cultivos ECACC - *European Collection of Animal Cell Culture*- con la referencia 08020601) y al anticuerpo monoclonal que produce denominado MGD3, que reconoce específicamente el receptor de membrana Dectin-1 humano. La solicitud internacional de la patente se encuentra actualmente en trámites.



Home IP Services PATENTSCOPE® Patent Search

(WO/2009/150275) HUMAN ANTI-DECTIN-1 ANTIBODY, HYBRIDOMA PRODUCING SAID ANTIBODY AND APPLICATIONS THEREOF

Biblio. Data

Description

Claims

National Phase

Notices

Documents

Latest bibliographic data on file with the International Bureau

Pub. No.: WO/2009/150275 **International Application No.:** PCT/ES2009/070206
Publication Date: 17.12.2009 **International Filing Date:** 05.06.2009

IPC: C07K 16/28 (2006.01), A61K 39/395 (2006.01), A61P 37/00 (2006.01), C07K 14/705 (2006.01), C12N 15/12 (2006.01)

Applicants: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117 E-28006 Madrid (ES) (*All Except US*).
 FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL DE LA PRINCESA [ES/ES]; C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta E-28006 Madrid (ES) (*All Except US*).
 KREMER BARÓN, Leonor [ES/ES]; (ES) (*US Only*).
 LLORENTE GOMEZ, Mercedes [ES/ES]; (ES) (*US Only*).
 CASASNOVAS, José María [ES/ES]; (ES) (*US Only*).
 FERNÁNDEZ RUIZ, Elena [ES/ES]; (ES) (*US Only*).
 GALÁN DÍEZ, Marta [ES/ES]; (ES) (*US Only*).

Inventors: KREMER BARÓN, Leonor; (ES).
 LLORENTE GOMEZ, Mercedes; (ES).
 CASASNOVAS, José María; (ES).
 FERNÁNDEZ RUIZ, Elena; (ES).
 GALÁN DÍEZ, Marta; (ES).

Agent: PONS ARIÑO, Ángel; (ES) .

Priority Data: P200801766 11.06.2008 ES

Title: (EN) HUMAN ANTI-DECTIN-1 ANTIBODY, HYBRIDOMA PRODUCING SAID ANTIBODY AND APPLICATIONS THEREOF
 (ES) ANTICUERPO ANTI-DECTIN-1 HUMANO, HIBRIDOMA PRODUCTOR DE DICHO ANTICUERPO Y SUS APLICACIONES

Abstract: (EN) The invention relates to hybridoma MGD3 and the monoclonal antibody produced thereby (also called MGD3), which specifically recognises the human Dectin-1 membrane receptor. Antibody MGD3 is capable of inhibiting the binding of Dectin-1 to the natural ligand thereof, the β -glucans that are components of the fungal wall. In addition, the aforementioned antibody specifically blocks binding to *Candida albicans* and the secretion of cytokines induced thereby. The MGD3 antibody obtained enables in vitro, ex vivo and in vivo detection of the human protein Dectin-1. Similarly, said antibody can be used to detect the level of expression of the receptor in human leukocytes, to define the role of this receptor in the pathogenesis of autoimmune illnesses and of conditions characterised by chronic inflammation and to ascertain the therapeutic effect of different anti-inflammatory and immunosuppressor agents. In addition, the MGD3 antibody may have therapeutic potential in chronic inflammatory illnesses.

(ES) La presente invención consiste en el hibridoma MGD3 y el anticuerpo monoclonal producido por él (denominado también MGD3), que reconoce de forma específica al receptor de membrana Dectin-1 humano. El anticuerpo MGD3 es capaz de inhibir la unión de Dectin-1 a su ligando natural, los β -glucanos que son componentes de la pared de los hongos. Además, bloquea específicamente la unión a *Candida albicans* así como la secreción de citoquinas inducidas por la misma. El anticuerpo MGD3 obtenido permite la detección in vitro, ex vivo e in vivo de la proteína humana Dectin-1. Del mismo modo, puede emplearse para detectar el nivel de expresión del receptor en leucocitos humanos y para definir el papel de este receptor en la patogenia de enfermedades autoinmunes y de condiciones caracterizadas por inflamación crónica así como para conocer el efecto terapéutico de distintos agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores. Además, el anticuerpo MGD3 podría tener potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas.

Designated States: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW)
Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
European Patent Office (EPO) (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)
African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publication Language: Spanish (ES)

Filing Language: Spanish (ES)

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 19 August 2009 (19.08.2009)

Information valid as of: 01 December 2009 (01.12.2009)

Report generated on: 23.04.2010

(10) Publication number:

WO2009/150275

(43) Publication date:

17 December 2009 (17.12.2009)

(26) Publication language:

Spanish (ES)

(21) Application Number:

PCT/ES2009/070206

(22) Filing Date:

05 June 2009 (05.06.2009)

(25) Filing language:

Spanish (ES)

(31) Priority number(s):

P200801766 (ES)

(31) Priority date(s):

11 June 2008 (11.06.2008)

(31) Priority status:

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01); **C07K 14/705** (2006.01); **C12N 15/12** (2006.01); **A61K 39/395** (2006.01); **A61P 37/00** (2006.01)

(71) Applicant(s):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117 E-28006 Madrid (ES) (*for all designated states except US*)

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL DE LA PRINCESA [ES/ES]; C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta E-28006 Madrid (ES) (*for all designated states except US*)

KREMER BARÓN, Leonor [ES/ES]; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES) (*for US only*)

LLORENTE GOMEZ, Mercedes [ES/ES]; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES) (*for US only*)

CASASNOVAS, José María [ES/ES]; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES) (*for US only*)

FERNÁNDEZ RUIZ, Elena [ES/ES]; Fundación Para la Investigación Biomedica del Hospital de La Princesa C/ Diego de León, 62 E-28006 Madrid (ES) (*for US only*)

GALÁN DÍEZ, Marta [ES/ES]; Fundación Para la Investigación Biomedica del Hospital de La Princesa C/ Diego de León, 62 E-28006 Madrid (ES) (*for US only*)

(72) Inventor(s):

KREMER BARÓN, Leonor; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES)

LLORENTE GOMEZ, Mercedes; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES)

CASASNOVAS, José María; Centro Nacional De Biotecnología (CNB) C/ Darwin, 3 E-28049 Madrid (ES)

FERNÁNDEZ RUIZ, Elena; Fundación Para la Investigación Biomedica del Hospital de La Princesa C/ Diego de León, 62 E-28006 Madrid (ES)

GALÁN DÍEZ, Marta; Fundación Para la Investigación Biomedica del Hospital de La Princesa C/ Diego de León, 62 E-28006 Madrid (ES)

(74) Agent(s):

PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4 E-28010 Madrid (ES)

(54) Title (EN): HUMAN ANTI-DECTIN-1 ANTIBODY, HYBRIDOMA PRODUCING SAID ANTIBODY AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Title (FR): ANTICORPS ANTI-DECTINE-1 HUMAINE, HYBRIDOME PRODUCTEUR DUDIT ANTICORPS ET SES APPLICATIONS

(54) Title (ES): ANTICUERPO ANTI-DECTIN-1 HUMANO, HIBRIDOMA PRODUCTOR DE DICHO ANTICUERPO Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract:

(EN): The invention relates to hybridoma MGD3 and the monoclonal antibody produced thereby (also called MGD3), which specifically recognises the human Dectin-1 membrane receptor. Antibody MGD3 is capable of inhibiting the binding of

Dectin-1 to the natural ligand thereof, the β -glucans that are components of the fungal wall. In addition, the aforementioned antibody specifically blocks binding to *Candida albicans* and the secretion of cytokines induced thereby. The MGD3 antibody obtained enables in vitro, ex vivo and in vivo detection of the human protein Dectin-1. Similarly, said antibody can be used to detect the level of expression of the receptor in human leukocytes, to define the role of this receptor in the pathogenesis of autoimmune illnesses and of conditions characterised by chronic inflammation and to ascertain the therapeutic effect of different anti-inflammatory and immunosuppressor agents. In addition, the MGD3 antibody may have therapeutic potential in chronic inflammatory illnesses.

(FR): La présente invention concerne l'hybridome MGD3 et l'anticorps monoclonal produit par ce dernier (également appelé MGD3), qui reconnaît de manière spécifique le récepteur membranaire de type Dectine-1 humaine. L'anticorps MGD3 peut inhiber la liaison de Dectine-1 à son ligand naturel, les β -glucanes qui sont des composants de la paroi des champignons. En outre, ledit anticorps bloque spécifiquement la liaison à *Candida albicans* ainsi que la sécrétion de cytokines induites par la Dectine-1. L'anticorps MGD3 obtenu permet la détection in vitro, ex vivo et in vivo de la protéine humaine Dectine-1. De la même façon, l'anticorps peut être utilisé pour détecter le niveau d'expression du récepteur dans des leucocytes humains et pour définir le rôle de ce récepteur dans la pathogénie de maladies auto-immunes et d'états caractérisés par une inflammation chronique ainsi que pour connaître l'effet thérapeutique de différents agents anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. En outre, l'anticorps MGD3 peut présenter un potentiel thérapeutique dans des maladies inflammatoires chroniques.

(ES): La presente invención consiste en el hibridoma MGD3 y el anticuerpo monoclonal producido por él (denominado también MGD3), que reconoce de forma específica al receptor de membrana Dectin-1 humano. El anticuerpo MGD3 es capaz de inhibir la unión de Dectin-1 a su ligando natural, los β -glucanos que son componentes de la pared de los hongos. Además, bloquea específicamente la unión a *Candida albicans* así como la secreción de citoquinas inducidas por la misma. El anticuerpo MGD3 obtenido permite la detección in vitro, ex vivo e in vivo de la proteína humana Dectin-1. Del mismo modo, puede emplearse para detectar el nivel de expresión del receptor en leucocitos humanos y para definir el papel de este receptor en la patogenia de enfermedades autoinmunes y de condiciones caracterizadas por inflamación crónica así como para conocer el efecto terapéutico de distintos agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores. Además, el anticuerpo MGD3 podría tener potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas.

International search report:

Received at International Bureau: 19 November 2009 (19.11.2009) [ES]

International preliminary examination report:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW
European Patent Office (EPO) : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

ANEXO 2

COPIA DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA
TESIS

Autores: Moreno-Ruiz, E. [†], Galán-Díez, M. [†], Zhu, W., Fernandez-Ruiz, E., d'Enfert, C., Filler, S.G., Cossart, P., and Veiga, E.

Título: *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism.

Revista: Cellular Microbiology 11, 1179-1189.

Año: 2009

[†] Estas personas han contribuido por igual en este trabajo.

Autores: Galán-Díez, M., Arana, D.M., Serrano-Gomez, D., Kremer, L., Casasnovas, J.M., Ortega, M., Cuesta-Dominguez, A., Corbi, A.L., Pla, J., and Fernandez-Ruiz, E.

Título: *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal *CEK1*-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through Dectin-1.

Revista: Infection and Immunity 78, 1426-1436.

* Artículo seleccionado por los Editores de la revista como *Spotlight* y portada del mes de Abril.

Año: 2010